



# Universidade Nova de Lisboa

## **EFEITO DE FACTORES DO HOSPEDEIRO E PARASITÁRIOS NA SUSCEPTIBILIDADE À MALÁRIA E GRAVIDADE DA DOENÇA**

Estudo de Alguns Polimorfismos Eritrocitários e das Espécies de *Plasmodium*

**MARIA FERNANDA AFONSO DIAS MONTEIRO**

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM  
MEDICINA TROPICAL NO RAMO DA PATOLOGIA E CLÍNICA DAS  
DOENÇAS TROPICAIS**

**SETEMBRO, 2011**



# Universidade Nova de Lisboa

## EFEITO DE FACTORES DO HOSPEDEIRO E PARASITÁRIOS NA SUSCEPTIBILIDADE À MALÁRIA E GRAVIDADE DA DOENÇA

Estudo de Alguns Polimorfismos Eritrocitários e das Espécies de *Plasmodium*

### **Candidato**

**Maria Fernanda Afonso Dias Monteiro, MD., ESP.**

Especialista em Medicina Interna

Mestre em Educação Médica

Professora Associada da Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto

Departamento de Medicina Interna - Hospital Américo Boavida

### **Orientador**

**Doutor Luís Varandas, MD., Ph.D., Professor Auxiliar**

Especialista em Pediatria

Unidade de Clínica Tropical e Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais

Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa

### **Co-Orientador**

**Doutora Ana Paula Arez, Ph.D., Investigadora Auxiliar com Agregação**

Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais

Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa

### **Comissão Tutorial**

**1. Orientador**

**2. Co-Orientador**

**3. Membro: Doutor Henrique Silveira, Ph.D., Professor Auxiliar com Agregação**

UEI Malária - Centro de Malária e Outras Doenças Tropicais

Instituto de Higiene e Medicina Tropical - Universidade Nova de Lisboa

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Medicina Tropical, no Ramo da Patologia e Clínica das Doenças Tropicais, realizada sob a orientação do Professor Doutor Luís Varandas, com o apoio financeiro da FCT, CMDT/IHMT/ Universidade Nova de Lisboa e Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto, Luanda-Angola.

*A Deus,  
pelos instantes de inspiração, pela luz, pela perseverança...*

*Ao Cássio Lucas  
que me irradiou de alegria,*

*Aos meus pais, que me ensinaram  
a gostar de aprender,*

*Ao Ângelo que me ensinou a ser adulta  
e nunca deixar de ser criança,*

*Ao Bruno, à Jeamína, à Regina, à Karíne,  
à Irína e à Katialíne, cujas vidas irradiam graça.*

## AGRADECIMENTOS

*“Mas eu sei bem em quem creio e estou bem certo que ELE é poderoso para guardar o meu tesouro até o dia apropriado de me entregar...”*

*São Paulo (Apóstolo)*

Agradeço ao Professor *Doutor Virgílio E. do Rosário*, ex-Coordenador do CMDT e Director da UEI Malária, Presidente do Conselho Científico do IHMT, pelo seu empenho especial neste Doutoramento, pelo seu encorajamento, disponibilidade e sabedoria que lhe são peculiares, enfim pelo seu incomensurável contributo, sem o qual não seria possível a concretização deste trabalho.

Agradeço à Direcção da Faculdade de Medicina em especial ao então *Decano Professor Doutor Cristóvão Simões* e ao actual *Decano Professor Doutor Miguel Bettencourt*, por terem validado a efectivação deste projecto assegurando um modesto mas valioso apoio financeiro à execução e processamento das amostras.

Agradeço à minha co-orientadora *Investigadora Doutora Ana Paula Arez*, pela sua disponibilidade, contribuição e orientação desde a concepção do projecto, pelo encorajamento na prossecução de um tema, continuamente muito inovador, pelo apoio bibliográfico, enfim pelo seu apoio incondicional.

Uma palavra de gratidão ao meu orientador *Professor Doutor Luís Varandas*, pela sua simplicidade, amizade e suas valiosas contribuições.

Ao *Professor Doutor Henrique Silveira*, por ter consentido integrar a comissão tutorial e pelos seus valiosos contributos.

A toda equipa do CMDT/IHMT/UNL que, com o seu saber, desempenho e dedicação, tornaram possível a concretização de um projecto, que para muitos não passou de uma utopia, os meus agradecimentos.

Estou grata ao meu colega *Professor Doutor Filomeno Fortes*, por me ter persuadido a participar neste grande e maravilhoso desafio e aos demais colegas de doutoramento de Angola, distintamente *Professores Doutores Maria Helena Agostinho e Paulo Adão Campos*.

Agradeço a contribuição incomensurável da *Doutoranda Cristina Mendes e Estagiárias Paula Figueiredo e Cláudia Sofia Gomes*, pelas suas persistentes disponibilidades manifestadas desde o início, no processamento das amostras, sem as quais não seria possível a concretização deste trabalho, enfim pelas horas disponibilizadas no enriquecimento científico desta pesquisa.

Ao *Investigador Doutor Bruno de Sousa*, os meus mais sinceros agradecimentos pela sua manifesta disponibilidade e valiosa contribuição na análise estatística e interpretação dos resultados.

Ao *Professor Doutor Luís Távora Tavira*, pela sua manifesta disponibilidade e boa vontade, na formatação e paginação da tese, sem a qual não seria possível a qualidade de apresentação deste trabalho.

Ao *Professor Dr. Alexandre Teixeira e Investigador Doutor Fernando Teles*, pela disponibilidade, apoio e paciência no ensino das TIC.

Um agradecimento especial à minha Chefe de Departamento e então Chefe de Serviço *Professora Doutora Maria Helena de Victoria Pereira Agostinho* e ao então Chefe de Departamento *Professor Dr. Jorge Lima*, pela compreensão, permitindo ausências sistemáticas, respectivamente no Departamento e Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Américo Boavida, durante a minha participação neste projecto.

Aos colegas doutorandos do CMDT/IHMT/UNL pela camaradagem, simpatia e partilha consentindo, desse modo, uma jornada menos árdua, em especial à *Doutoranda Zoraima Neto* pelo seu contributo e *Doutora Joana Alves*, pela sua manifesta disponibilidade na cedência da versão em papel da sua vasta bibliografia.

Ao Sr. *António Pedro de Sá* do Gabinete de Informática do IHMT/UNL, pelo seu apoio incondicional.

Aos técnicos de laboratório *José Adão Francisco, Victória Vicente Ferreira*, pela valiosa colaboração e contribuição na recolha das amostras realizadas nas diferentes províncias, na pesquisa parasitológica, na distribuição e recolha dos questionários, enfim em todo o processo de pesquisa no terreno.

Agradeço à equipa do Programa Nacional de Controlo da Malária, em especial à *Dr.ª Carolina Ferreira, Dr. Francisco Teles* e aos técnicos do programa, pela

disponibilidade e valiosa contribuição, especialmente na garantia da logística, sem a qual não seria possível a recolha das amostras nas províncias estudadas.

Aos Delegados de Saúde e Directores dos Hospitais Provinciais, aos Técnicos de Laboratório, aos Enfermeiros e a todas as equipas de saúde das províncias estudadas, pelo apoio, disponibilidade e participação espontânea durante as colheitas das amostras.

Ao Ministério do Planeamento da República de Angola distintamente à Sr<sup>a</sup> Ministra *Dr.<sup>a</sup> Ana Dias Lourenço*, ao Sr. Vice Ministro *Dr. Pedro Luís da Fonseca* e Director da Direcção de Planeamento - *Dr. Flávio Couto*, pela excelente contribuição, concessão dos dados estatísticos e informação sociodemográfica do país.

Ao *Professor Dr. Raul Feio* pela sua valiosa contribuição na pesquisa e informação sobre os dados sociodemográficos do país.

Agradeço ao Governo da Província de Malange, em especial à *Sra. Dra. Teresa de Abreu*, *Administradora Municipal de Malange* e ao *Sr. Irineu António Gongga*, pela manifesta colaboração e prontidão na cedência de dados sociodemográficos da província.

Um agradecimento especial à *Dra. Rosa Cruz e Silva*, *Doutoranda em História de África*, pela Universidade de Lisboa-Faculdade de Letras, pelo seu valioso contributo na pesquisa sobre os dados antropológicos da população de Angola.

Agradeço à equipa do Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica do Ministério das Telecomunicações e Tecnologias de Informação de Angola, distintamente aos técnicos *Joaquim Neto* e *João Manuel Martins*, do Departamento de Aplicações Meteorológicas, pelo valioso contributo na cedência dos dados meteorológicos do país.

Não deixarei de agradecer anonimamente às *populações de todas as localidades* das áreas de estudo, por terem acreditado e consentido participar voluntária e gratuitamente neste projecto.

Agradeço a *todas as pessoas* que de alguma forma contribuíram para este trabalho de pesquisa e que apesar de não terem sido mencionadas, o seu contributo não foi, de modo algum, menos precioso. E também a *tantos outros*, que fazem dos meus dias uma verdadeira luta sem tréguas.

Uma menção e agradecimento muito especial à *Dra. Júlia Maria Freire Moura Rocha* e ao meu primo *José Carlos Neves* pela empenhada colaboração na correcção



ortográfica do trabalho e aos meus amigos *Nilza e Euclides Batalha*, pelo apoio incondicional, durante a minha estadia em Lisboa.

Gostaria de agradecer aos *meus filhos* e ao *meu neto*, porque fazem da minha vida uma sucessão de dias felizes. Por isso, *obrigada à minha família*, particularmente às *minhas irmãs, cunhados e sobrinhos*, pelo apoio incondicional.

Finalmente, um agradecimento especial aos *meus amigos* e também àqueles que se pronunciam como *meus inimigos*, por me proporcionarem uma vida tão rica.

## RESUMO

A malária é considerada como a doença parasitária mais séria em humanos, infectando cerca de 5 a 10% da população mundial, estimando-se entre 300 a 600 milhões de casos e mais de dois milhões de mortes, anualmente. Apesar da severidade da doença, a compreensão da variabilidade da resposta do hospedeiro à infecção (traduzida desde a infecção silenciosa até formas crónicas da doença, passando por quadros clínicos potencialmente fatais), continua a ser um dos grandes desafios da investigação médica.

Vários factores genéticos parasitários ou do hospedeiro, estado imune e níveis de exposição, contribuem para esta variabilidade, mas a sua importância relativa para a carga total da doença tem sido pouco estudada. Entre outros, é possível salientar como fontes importantes de variabilidade na susceptibilidade à malária e gravidade da doença, factores intrínsecos ao hospedeiro tais como polimorfismos genéticos relacionados com as células sanguíneas e factores parasitários como a composição da(s) população(ões) parasitária(s) presentes na infecção.

Factores do hospedeiro humano relacionados com as células sanguíneas (drepanocitose e deficiência na glucose-6-fosfato desidrogenase - G6PD) têm sido tradicionalmente estudados e relacionados com a gravidade da malária causada por *Plasmodium falciparum*.

Relativamente às populações parasitárias, das cinco espécies que infectam humanos, *P. falciparum* continua a ser responsável pela malária grave, apesar de muito recentemente alguma gravidade ser atribuída a *Plasmodium vivax*. Sabe-se que nas mesmas áreas outras espécies coexistem em muito maior prevalência, contrariando o que se pensava há algum tempo. Apesar de poucos estudos terem focado o tema das infecções mistas, existem alguns relatos de que eventuais interações entre as diferentes espécies presentes simultaneamente no mesmo hospedeiro podem afectar a susceptibilidade à doença.

Com o objectivo geral de avaliar o efeito e a contribuição destes factores na susceptibilidade e gravidade da malária, analisando e comparando três grupos (estudo de caso-controlo) doentes com malária grave (MG), doentes com malária não-complicada (Mnc) e indivíduos infectados assintomáticos (IA), realizámos em Angola

de 2007 a 2010, um estudo em sete das 18 províncias com distintos níveis de endemicidade. Foram obtidas 1.416 amostras de sangue periférico de 1.198 indivíduos assintomáticos e 218 doentes. O DNA obtido a partir destes isolados foi utilizado para detecção da presença de variantes genéticas relacionados com os eritrócitos (drepanocitose – análise do gene *HBB*, deficiência G6PD – análise do gene *G6PD*, antígeno Duffy-análise do gene *DARC*) e identificação das espécies de *Plasmodium* presentes, através de nested-PCR mediante a amplificação dos genes que codificam a subunidade menor do RNA ribossomal. Os resultados demonstraram prevalências superiores às anteriormente descritas em relação às seguintes espécies parasitárias: *P. falciparum* 98,2% vs 92,0% e *Plasmodium malariae* 10,7% vs 1,0% e inferior em relação a *P. vivax* 2,5% vs 7,0%. Foi reconfirmada a presença de *Plasmodium ovale* (descrita anteriormente), mas não publicada em documentos oficiais e relatada pela primeira vez em Angola a presença de infecções mistas (duplas e triplas) (15,7%) e de infecção por *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos (dados publicados). Relativamente aos polimorfismos relacionados com os genes *HBB* e *G6PD* e provável associação com a protecção à malária, os nossos resultados confirmam a associação do traço falciforme (heterozigotia *HbS*), com a protecção à doença (OR = 0,30; IC 95% 0,18-0,49;  $p < 0,001$ ). Contudo, não foi encontrada, quer nos indivíduos hemizigóticos, quer nos heterozigóticos para o alelo G6PD (A<sup>-</sup>) nenhuma evidência para a protecção a malária (MG e Mnc) (OR = 1,69; IC 95% 0,91-3,13;  $p = 0,096$ ). Os resultados desta investigação requerem um estudo mais aprofundado, com uma dimensão amostral maior, necessário à confirmação da nossa observação.

## ABSTRACT

Malaria is considered the most serious parasitic disease in humans, infecting about 5 to 10% of the world's population, estimated between 300 and 600 million cases and more than 2 million deaths annually. Despite the severity of the disease, understanding the variability of host response to infection (translated from silent infection to chronic forms of the disease, through clinical potentially fatal) remains a major challenge of medical research.

Several human genetic factors, the parasite or the host immune status and exposure levels, contribute to this variability, but their relative importance to the total burden of disease has been poorly studied. Among others, it is possible to highlight as important sources of variability in susceptibility to malaria and disease severity, the host intrinsic factors such as genetic polymorphisms related to blood cells and parasitic factors such as the composition of parasite population(s) in the infection.

Host factors related to human blood cells (sickle cell anemia, and impaired glucose-6-phosphate dehydrogenase - G6PD) have traditionally been studied and related to the severity of malaria caused by *Plasmodium falciparum*.

For the parasite populations, the five species that infect humans, *P. falciparum* continues to be responsible for severe malaria, although recently some severity is attributed to *Plasmodium vivax*. It is known that in the same areas, other species coexist in much greater prevalence, contrary to what was previously thought and although few studies have focused the theme of mixed infections, there are some reports of possible interactions between different species present simultaneously on the same host that may affect susceptibility to disease.

With the general aim of evaluating the effect and contribution of these factors in susceptibility and severity of malaria, analyzing and comparing three groups (case-control study) patients with severe malaria (SM), patients with malaria not complicated (Mnc) and asymptomatic infected individuals (AI). We held from 2007 to 2010, in Angola, a study in seven of eighteen provinces, with different levels of endemicity. 1.416 samples were obtained from peripheral blood from 1.198 asymptomatic individuals and 218 patients. The DNA obtained from isolated cases were used to detect the presence of genetic variants associated with red blood cells (sickle cell disease -

analysis of *HBB*, G6PD deficiency - analysis of the *G6PD* gene, Duffy antigen-DARC gene analysis) and identification of the presence of *Plasmodium* species, by using nested-PCR amplification of genes encoding the small subunit ribosomal RNA. Results showed prevalence rates higher than those previously described in relation to the following parasite species: *P. falciparum* 98,2% vs 92,0%; *Plasmodium malariae* 10,7% vs 1,0 % and lower rates in relation to *P. vivax* 2,5% vs 7,0%. It was reconfirmed the presence of *Plasmodium ovale* (described previously), but not published in official documents. First reported in Angola, the presence of mixed infections (double and triple) (15,7%) and infection by *P. vivax* in Duffy-negative individuals (published data). For polymorphisms related to *G6PD* and *HBB* genes and probable association with malaria protection, our results confirm the association of sickle cell trait (*HbS* heterozygosity), with protection to disease (OR = 0,30; 95% CI 0,18-0,49;  $p < 0,001$ ), but this was not found in carriers of G6PD ( $A^-$ ) allele individuals hemizygous or heterozygous G6PD ( $A^-$ ) no evidence for malaria protection (SM, Mnc) (OR = 1,69; 95% CI 0,91-3,13;  $p = 0,096$ ). The results of this research require further study with larger sample size necessary to confirm our observations.

## PUBLICAÇÕES E COMUNICAÇÕES RESULTANTES DESTE TRABALHO

### 1. PUBLICAÇÕES

Mendes C., **Dias F.**, Figueiredo J., Gonzalez V.M., Cano J., de Sousa S., do Rosário V.E., Benito A., Berzosa P., Arez A.P. **2011**. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *Plasmodium vivax* – molecular evidences from the African West Coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**: e1192. DOI:10.1371/journal.pntd.000119.

Mendes C., **Dias F.**, do Rosário V.E., Varandas L., Arez A.P. **2007**. Prevalence of *Plasmodium sp.* infection in children in the Cuanza Sul province, Angola. *Proceedings of the 5th European Congress on Tropical Medicine and International Health* 181-184.

**Dias F.**, Mendes C., do Rosário V.E., Varandas L., Arez A.P.- Prevalência de infecção por *Plasmodium sp.* na zona rural de Angola (manuscrito concluído para submeter a revista brasileira).

**Dias F.**, Mendes C., do Rosário V.E., Varandas L., Arez A.P. - Sickle Cell Trait, Red Cell G6PD status and risk of mixed *Plasmodium* species in Angola (manuscrito em preparação).

### 2. COMUNICAÇÕES CIENTÍFICAS EM CONGRESSOS

VII Congresso Internacional de Médicos em Angola, Luanda, Janeiro de **2011**. Comunicação oral: **Dias F.**, Mendes C., do Rosário V.E., Varandas L., Arez A.P. - *Efeito de Factores do Hospedeiro e Parasitários na Susceptibilidade à Malária e Gravidade da Doença* (Dados preliminares).

IV Congresso Lusófono 09, Recife, Brasil, Novembro de **2009**. Comunicação oral: **Dias F.**, Mendes C., do Rosário V.E., Varandas L., Arez A.P. - *Avanços na investigação da Malária em Angola - Prevalência das infecções mistas por Plasmodium sp. em Angola*.

IV Congresso Internacional de Médicos em Angola, Luanda, Janeiro de **2008**. Comunicação oral: **Dias F.**, Mendes C., do Rosário V.E., Varandas L., Arez A.P. - *Prevalência da infecção por Plasmodium sp. em crianças da província do Cuanza Sul, Angola*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
I.1	Componentes da estratégia do Programa Global (WHO, 2009)	11
I.2	Categorização de países em função do estado de controlo da malária	12
I.3	Mapa de Angola	16
I.4	Morbilidade por malária em Angola de 1999 - 2009	19
II.1	Distribuição de níveis de endemicidade por <i>P. falciparum</i> , nas áreas de risco	29
II.2	Distribuição global da malária por <i>P. falciparum</i> e <i>P. vivax</i> , em 2007	30
II.3	Países endémicos de malária distribuídos em quatro regiões	31
III.1	Ciclo de vida do <i>Plasmodium sp.</i>	43
III.2	Hemólise do eritrócito parasitado	45
III.3	Mecanismos de interacção entre as células endoteliais e plaquetas na malária cerebral	51
III.4	Resultado clínico da interacção de vários factores (parasitário, hospedeiro e sociogeográficos), na patogénese da malária em África	63
IV.1	Efeito protector da anemia falciforme contra a malária cerebral experimental	87
IV.2	Correlação entre a incidência geográfica da malária e a frequência alélica <i>HbS</i> e talassémia na África subsariana	91
V.1	Mapa de distribuição mundial da deficiência em G6PD	95
V.2	Representação esquemática da via das pentoses-fosfato. Ressalta a importância da G6PD na produção de GSH reduzida, da ribose e da NADPH	97
V.3	Modelo tridimensional de um dímero da G6PD. Duas subunidades idênticas em torno de um eixo simétrico	98
V.4	Localização do gene <i>G6PD</i> no cromossoma X	99
V.5	Esquema representativo das mutações mais comuns que codificam a sequência do gene <i>G6PD</i>	101
VI.1	Características da parasitémia nas fases pré-eritrocítica e eritrocítica das diferentes espécies de malária em humanos	117
III.1.1	Mapa de Angola - sinalização das províncias envolvidas no estudo de acordo com os diferentes níveis de endemicidade	137
III.1.2	Exemplo dos produtos de PCR obtidos pela técnica <i>ASA-bidireccional</i> descrita por Waterfall & Cobb (2001)	149

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
III.1.3	Exemplo de produtos amplificados obtidos por <i>PCR</i> para detecção do genótipo da <i>G6PD</i> , utilizando os <i>primers</i> descritos por Tishkoff <i>et al.</i> (2001)	150
III.1.4	Exemplo de produtos amplificados obtidos por <i>PCR</i> para detecção do genótipo da <i>G6PD</i> , utilizando os <i>primers</i> descritos por Tishkoff <i>et al.</i> (2001)	150
III.1.5	Exemplo da restrição dos produtos amplificados, utilizando as endonucleases Fok I (exão 5) e Nla III (exões 3/4)	151
III.1.6	Figura representativa do produto amplificado das quatro espécies de <i>Plasmodium</i> , utilizando os <i>primers</i> descritos por Snounou <i>et al.</i> (1993)	153
IV.1.1	Totais (%) de infecções simples e mistas por <i>Plasmodium sp.</i> por província estudada	167
IV.1.2	Prevalência (%) de infecções simples e mistas por <i>Plasmodium sp.</i> nos três municípios da província do Cuanza Sul	169
IV.1.3	Prevalência (%) de infecção por <i>Plasmodium sp.</i> de acordo com os grupos etários	170
IV.1.4	Distribuição (%) de infecção por <i>Plasmodium sp.</i> em crianças do grupo etário ≤ de 5 anos	171
IV.1.5	Frequências genotípicas e alélicas do gene <i>G6PD</i> , na população estudada	172
IV.1.6	Distribuição (%) dos genótipos da <i>G6PD</i> , encontrados na amostra, por sexo	173
IV.1.7	Frequências genotípicas e alélicas do gene <i>G6PD</i> na província do Cuanza Sul	174
IV.1.8	Frequências genotípicas e alélicas do gene <i>G6PD</i> na província do Bengo	174
IV.1.9	Frequências genotípicas e alélicas do gene <i>G6PD</i> , na província do Huambo	175
IV.2.1	Distribuição de frequências (%) dos três grupos de estudo por sexo	178
IV.2.2	Distribuição de frequências dos grupos de estudo por grupos etários	179
IV.2.3	Distribuição de frequências (n) dos genótipos do gene <i>HBB</i> , por províncias estudadas	182
IV.2.4	Frequências genotípicas e alélicas do gene <i>G6PD</i> nos grupos de estudo	183
IV.2.5	Frequência de manifestações de MG, nos seleccionados	187



## LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
I.1	Estratificação epidemiológica da malária em Angola	20
II.1	Classificação da malária em função da estabilidade (pós Bruce-Chwatt, 1980)	26
II.2	Classificação das zonas de endémia	28
II.3	Aplicação da técnica de PCR no estudo epidemiológico da malária	35
III.1	Distribuição representativa de quatro espécies de <i>Plasmodium sp.</i> no mundo	40
III.2	Moléculas do hospedeiro que medeiam a citoaderência dos eritrócitos infectados por <i>P.falciparum</i> associados a resistência ou susceptibilidade à malária.	50
III.3	Combinações baseadas na artemisinina (ACT) mais comuns	60
III.4	Outras combinações (ACT) de pouca utilização na África subsariana	61
IV.1	Mecanismos de variantes eritrocitárias mais comuns na protecção à malária	83
IV.2	Manifestações clínicas mais frequentes da anemia de células falciformes	89
V.1	Drogas e outros químicos associados à hemólise aguda em pacientes com deficiência em G6PD	105
III.1.1	Distribuição (%) da população de Angola, por grupos etários, género e locais de habitação - INE/IBEP, 2009	135
III.1.2	Angola no contexto Regional Africano	136
III.1.3	Indicadores de malária grave e sinais de mau prognóstico	145
III.1.4	Resumo da colheita de material biológico nas diferentes localidades	147
IV.1.1	Prevalência de infecção por <i>Plasmodium sp.</i> nos sete municípios de acordo com o período de colheita das amostras	166
IV.1.2	Prevalência (%) de infecções simples e mistas por <i>Plasmodium sp.</i> nas três províncias de Angola (Cuanza Sul, Bengo e Huambo)	166
IV.1.3	Distribuição de ( <i>O</i> ) de infecção por <i>Plasmodium sp.</i> nos municípios da província do Cuanza Sul	169
IV.1.4	Distribuição de frequências de infecção simples e mista por total de infectados em cada grupo etário	170
IV.1.5	Frequências genotípicas e alélicas do gene <i>HBB</i> nas três províncias	171
IV.1.6	Frequências genotípicas do gene <i>HBB</i> por grupos etários	172

<b>Tabela</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
IV.1.7	Frequências de infecção por <i>Plasmodium sp.</i> e polimorfismo eritrocitário ( <i>HBB</i> e <i>G6PD</i> )	176
IV.1.8	Caracterização de indivíduos <i>Duffy</i> - negativos	177
IV.2.1	Distribuição de ( <i>O</i> ) nos grupos de estudo, por grupos etários	179
IV.2.2	Distribuição de frequências nos grupos de estudos por províncias segundo os níveis de endemicidade	180
IV.2.3	Distribuição de frequências da composição da(s) população(ões) parasitária(s) presentes na infecção por grupos de estudo	181
IV.2.4	Distribuição de frequências dos genótipos <i>HBB</i> por grupos etários	181
IV.2.5	Distribuição de frequências dos genótipos <i>HBB</i> por grupos de estudo	183
IV.2.6	Distribuição de frequências dos genótipos <i>G6PD</i> por grupos de estudo	184
IV.2.7	Distribuição do alelo ( <i>A</i> <sup>-</sup> ) <i>G6PD</i> por diferentes províncias	185
IV.2.8	Distribuição do alelo ( <i>A</i> <sup>-</sup> ) <i>G6PD</i> em doentes com malária e infectados assintomáticos	186
IV.2.9	Distribuição do genótipo <i>HbAS</i> em doentes com malária e infectados assintomáticos	186
IV.2.10	Distribuição de seleccionados portadores de genótipos <i>HbAS</i> + <i>G6PD</i> ( <i>A</i> <sup>-</sup> ) por grupos de estudo	187

## ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

<b>Aa</b>	Aminoácido
<b>AC</b>	Antes de Cristo
<b>AMA-1</b>	<i>Apical membrane antigen-1</i>
<b>AMIS</b>	<i>Angola Malaria Indicator Survey</i>
<b>ACT</b>	<i>Artemisinin combination therapies</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARDS</b>	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr</b>	ARN ribossomal
<b>ASA</b>	<i>Allele specific amplification</i>
<b>ASM</b>	Anemia severa da malária
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BM</b>	Banco Mundial
<b>BrEt</b>	Brometo de Etídio
<b>CAP</b>	Conhecimentos Atitudes e Práticas
<b>CID</b>	Coagulação Intravascular Disseminada
<b>CMDT</b>	Centro de Malária e outras Doenças Tropicais
<b>COSEP</b>	Consultoria de Serviços Estudos e Pesquisas
<b>CPLP</b>	Comunidade dos Países de Língua Portuguesa
<b>CR1</b>	<i>Erythrocyte – complement receptor 1</i>
<b>CQ</b>	Cloroquina
<b>DC</b>	Depois de Cristo
<b>DDT</b>	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
<b>(E)</b>	Frequência esperada
<b>FMUAN</b>	Faculdade de Medicina da Universidade Agostinho Neto
<b>FNUAP</b>	Fundo das Nações Unidas para a População
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<i>Tumour necrosis factor <math>\alpha</math></i>
<b>HABV</b>	Hospital Américo Boavida
<b>G</b>	Guanina
<b>G6PD</b>	Glucose-6-fosfato Desidrogenase

<b>G6PD</b>	(gene que codifica a proteína) Glucose-6-fosfato Desidrogenase
<b>G6PDA</b>	Variante A do gene <i>G6PD</i> (portadora de uma mutação no exão 4)
<b>G6PDA<sup>-</sup></b>	Variante A <sup>-</sup> ou deficiente do gene <i>G6PD</i> (portadora de duas mutação nos exões 4 e 5)
<b>G6PDB</b>	Variante B, normal ou selvagem do gene <i>G6PD</i>
<b>G6PDMed</b>	Variante Mediterrânea da G6PD
<b>G6PD<sup>+</sup></b>	Genótipos da G6PD com actividade enzimática presumivelmente normal
<b>G6PD<sup>±</sup></b>	Genótipos da G6PD com actividade enzimática presumivelmente intermédia
<b>G6PD<sup>-</sup></b>	Genótipos da G6PD com actividade enzimática presumivelmente deficiente
<b>GIS</b>	<i>Geographical Information Systems</i>
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HbA</b>	Hemoglobina A ou variante normal ou selvagem que codifica a HbA hemoglobina
<b>HBB</b>	Gene da Hemoglobina
<b>HbC</b>	Hemoglobina C
<b>HbC</b>	Variante que codifica a proteína <i>HbC</i>
<b>HbS</b>	Hemoglobina S ou falciforme ou alelo mutado que codifica esta proteína
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigen</i>
<b>HP</b>	Hiperparasitémia
<b>HRP 2</b>	<i>Histidine-rich protein II</i>
<b>(i)</b>	Resíduos
<b>IA</b>	Infectados assintomáticos
<b>IBEP</b>	Inquérito Integrado Sobre o Bem-estar da População
<b>ICAM1</b>	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
<b>IBM SPSS Statistics 19</b>	<i>Statistical Package for Social Sciences versão 19.0</i>
<b>IHMT</b>	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
<b>IIAA</b>	Instituto de Investigação Agronómica de Angola
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estatística de Angola
<b>IP</b>	Índices parasitários ou Índice plasmódico
<b>IR</b>	Insuficiência renal

<b>IRA</b>	Insuficiência Respiratória Aguda
<b>ITNs</b>	<i>Insecticide treated nets</i> - Rede mosquiteira tratada com insecticidas
<b>MC</b>	Malária cerebral
<b>MG</b>	Malária grave
<b>MHC</b>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<b>MIAA</b>	Missão de Inquéritos Agrícolas de Angola
<b>MINPLA</b>	Ministério do Planeamento de Angola
<b>MIN</b>	<i>Multilateral Initiative on Malaria</i>
<b>MINSa</b>	Ministério da Saúde de Angola
<b>Mnc</b>	Malária não complicada
<b>MO</b>	Microscopia óptica
<b>NADP</b>	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
<b>NI</b>	Não infectados
<b>(O)</b>	Frequência observada
<b>ODMs</b>	Objectivos de Desenvolvimento do Milénio
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>ONU</b>	Organização das Nações Unidas
<b>ONG</b>	Organização Não Governamental
<b>OUA</b>	Organização de Unidade Africana
<b>ORMED</b>	Ordem dos Médicos de Angola
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PECAM-1</b>	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule -1</i>
<b>PD</b>	<i>Pyrogenic density</i>
<b>PfEMP-1</b>	<i>P. falciparum erythrocyte membrane protein-1</i>
<b>PIB</b>	Produto Interno Bruto
<b>pLDH</b>	<i>Parasite lactate dehydrogenase</i>
<b>PNCM</b>	Programa Nacional de Controlo da Malária
<b>PNLM</b>	Programa Nacional de Luta Contra a Malária
<b>PNUD</b>	Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
<b>PK</b>	Piruvato cinase (Piruvato Kinase)
<b>PKLR</b>	Gene que codifica a Piruvato cinase
<b>RBM</b>	<i>Roll Back Malaria</i>
<b>RDT</b>	<i>Rapid Diagnostic Test</i>

<b>RESA</b>	<i>Ring-infected erythrocyte surface antigen</i>
<b>SDIP</b>	Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias
<b>SDRA</b>	Síndrome de Stresse Respiratório Agudo
<b>SMA</b>	<i>Severe malaria anemia</i>
<b>TB</b>	Tuberculose
<b>SNPs</b>	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
<b>SNS</b>	Serviço Nacional de Saúde
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<i>Transforming growth factor- <math>\beta</math></i>
<b>TIP</b>	Tratamento intermitente preventivo
<b>UAN</b>	Universidade Agostinho Neto
<b>UTIS</b>	Unidades de Tratamento com Insecticidas
<b>UNDP</b>	<i>United Nations Development Programme</i>
<b>UNFPA</b>	<i>United Nations Population Fund</i>
<b>UNICEF</b>	<i>United Nations Children's Fund</i>
<b>UNL</b>	Universidade Nova de Lisboa
<b>VSA</b>	<i>Variante surface antigens</i>
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

# ÍNDICE

<b>CAPÍTULO. 1 .....</b>	<b>1</b>
I. INTRODUÇÃO .....	3
I.1. HISTÓRIA DA DOENÇA.....	3
I.2. ESFORÇOS DE ERRADICAÇÃO MUNDIAL DA MALÁRIA: SUCESSOS E FRACASSOS (1955-1978) .	5
I.3. A INICIATIVA MULTILATERAL EM MALÁRIA E A INVESTIGAÇÃO CIENTÍFICA EM ÁFRICA. ....	7
I.4. ADOÇÃO DE POLÍTICAS E ESTRATÉGIAS DE CONTROLO DA MALÁRIA .....	8
I.5. O IMPACTO GLOBAL DO CONTROLO DA MALÁRIA .....	9
I.6. ESTIMATIVAS GLOBAIS DE CASOS E MORTES POR MALÁRIA (2009-2010).....	12
I.7. AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS INTERVENÇÕES DE MALÁRIA NA REGIÃO AFRICANA .....	13
I.8. MALÁRIA EM ANGOLA .....	15
I.8.1. CARACTERIZAÇÃO DO PAÍS .....	15
I.8.1.1. CARACTERÍSTICAS ANTROPOLÓGICAS DA POPULAÇÃO .....	17
I.8.1.2. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO .....	18
I.8.2. HISTÓRICO DA MALÁRIA EM ANGOLA.....	21
II. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA.....	24
II.1. INTRODUÇÃO .....	24
II.2. MALÁRIA ESTÁVEL E INSTÁVEL.....	26
II.3. CLASSIFICAÇÃO DA ENDEMIA MALÁRICA .....	28
II.4. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DA MALÁRIA.....	30
II.5. DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO MALÁRICA .....	32
II.5.1. INDICADORES PARASITÁRIOS.....	36
II.5.1.1. PREVALÊNCIA .....	36
II.5.1.2. DEFINIÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE MALÁRIA CLÍNICA .....	37
III. ETIOLOGIA E IMUNOPATOGENESE .....	39
III.1. O PARASITA ( <i>PLASMODIUM</i> ) .....	39
III.2. CICLO DE VIDA DO <i>PLASMODIUM</i> HUMANO .....	41
III.3. PATOGENESE E IMUNIDADE DA MALÁRIA .....	46
III.3.1. CITOQUINAS .....	47
III.3.2. CITOADERÊNCIA E SEQUESTRO.....	48
III.3.3. ROSETTING .....	52
III.4. PROCESSOS IMUNOLÓGICOS NA PATOGENESE DA MALÁRIA.....	53
III.4.1. A RESPOSTA IMUNE.....	54
III.4.2. IMUNIDADE HUMORAL.....	55
III.4.3. IMUNIDADE CELULAR .....	56
III.5. CLÍNICA DA MALÁRIA .....	57
III.6. MALÁRIA GRAVE .....	61
a) GENÉTICA DA MALÁRIA GRAVE E PATOGENESE.....	61
b) DEFINIÇÃO E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DE MALÁRIA GRAVE .....	63
III.7. COMPLICAÇÕES DA MALÁRIA GRAVE .....	66

III.7.1.	MALÁRIA CEREBRAL .....	66
III.7.2.	ANEMIA SEVERA DA MALÁRIA .....	68
a)	AUMENTO DA LISE DOS ERITRÓCITOS .....	69
b)	PRODUÇÃO REDUZIDA DE ERITRÓCITOS .....	69
c)	DEFINIÇÃO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA ASM .....	70
III.7.3.	INSUFICIÊNCIA RESPIRATÓRIA E ACIDOSE METABÓLICA .....	71
III.7.4.	HIPOGLICEMIA .....	73
III.7.5.	INSUFICIÊNCIA RENAL .....	73
III.7.6.	HIPOTENSÃO E CHOQUE .....	74
III.7.7.	OUTRAS ANORMALIDADES HEMATOLÓGICAS .....	74
a)	LEUCÓCITOS .....	75
b)	PLAQUETAS .....	75
c)	ALTERAÇÕES DA COAGULAÇÃO .....	76
III.8.	TRATAMENTO .....	77
III.8.1.	TRATAMENTO DA MALÁRIA GRAVE .....	77
III.8.2.	TRATAMENTO DA MALÁRIA POR <i>P. malariae</i> , <i>P. ovale</i> E <i>P. vivax</i> .....	78
IV.	FACTORES DO HOSPEDEIRO HUMANO NA SUSCEPTIBILIDADE\RESISTÊNCIA À MALÁRIA .....	79
IV.1.	INTRODUÇÃO .....	79
IV.1.1.	POLIMORFISMO ERITROCITÁRIO .....	81
IV.1.2.	DISTÚRBIOS GENÉTICOS .....	82
IV.2.	POLIMORFISMO GENÉTICO RELACIONADO COM DREPANOCITOSE OU ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES .....	84
IV.2.1.	GENE <i>HBB</i> .....	85
IV.2.2.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA ANEMIA DE CÉLULAS FALCIFORMES OU DREPANOCITOSE .....	88
IV.3.	OUTRAS HEMOGLOBINOPATIAS - TALASSÉMIAS .....	90
IV.4.	ENZIMOPATIAS ERITROCITÁRIAS .....	91
IV.5.	OUTROS POLIMORFISMOS ERITROCITÁRIOS .....	92
V.	POLIMORFISMO GENÉTICO RELACIONADO COM A DEFICIÊNCIA EM GLUCOSE - 6 - FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD) .....	94
V.1.	INTRODUÇÃO .....	94
V.2.	FUNÇÃO ENZIMÁTICA DA G6PD .....	95
V.3.	O GENE .....	98
V.4.	VARIANTES DA G6PD .....	99
V.5.	FISIOPATOLOGIA DA DEFICIÊNCIA EM G6PD E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS .....	103
a)	ANEMIA HEMOLÍTICA INDUZIDA POR DROGAS .....	105
b)	ANEMIA HEMOLÍTICA INDUZIDA POR INFECÇÕES .....	105
c)	FAVISMO .....	106
d)	ICTERÍCIA NEONATAL .....	107
V.6.	G6PD E PROTECÇÃO CONTRA A MALÁRIA .....	107
VI.	COMPOSIÇÃO DA(S) POPULAÇÃO(ÕES) PARASITÁRIA(S) .....	110
VI.1.	INTRODUÇÃO HISTÓRICA .....	110
VI.2.	DIVERSIDADE DAS ESPÉCIES .....	111
VI.3.	INTERACÇÃO DAS ESPÉCIES .....	113
VI.4.	DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES MISTAS .....	114



VI.5.	DINÂMICA DA INFECÇÃO .....	116
VI.6.	RESPOSTA IMUNOLÓGICA – REACÇÃO-CRUZADA .....	119
VI.7.	EFEITOS SOBRE A PATOLOGIA .....	119

## **CAPÍTULO. 2.....123**

II.	JUSTIFICATIVA.....	125
II.1.	OBJECTIVOS .....	129
II.1.1.	OBJECTIVO GERAL .....	129
II.1.2.	OBJECTIVOS ESPECÍFICOS .....	129
II.2.	HIPÓTESES DE TRABALHO.....	130

## **CAPÍTULO. 3.....131**

III.	MATERIAL E MÉTODOS .....	133
III.1.	ÁREAS DE ESTUDO .....	133
III.1.1.	CARACTERÍSTICAS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS DE ANGOLA .....	133
III.1.2.	LOCAIS DE ESTUDO.....	137
III.1.2. a –	BENGO .....	138
III.1.2. b –	CABINDA.....	138
III.1.2. c –	CUANZA NORTE .....	139
III.1.2. d –	CUANZA SUL.....	139
III.1.2. e –	HUAMBO .....	140
III.1.2. f –	LUANDA .....	141
III.1.2.g –	MALANGE .....	141
III.2.	TIPOLOGIA DO ESTUDO.....	142
III.3.	POPULAÇÃO ESTUDADA .....	143
III.3.1.	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	143
a)	ESTUDO EXPLORATÓRIO .....	143
b)	ESTUDO ANALÍTICO CASO-CONTROLO .....	143
c)	DEFINIÇÕES OPERACIONAIS OU VARIÁVEIS EM ESTUDO:.....	144
III.3.2.	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO .....	145
III.4.	COLHEITA DAS AMOSTRAS E MATERIAL BIOLÓGICO.....	146
III.5.	PROCESSAMENTO LABORATORIAL.....	148
III.5.1.	POLIMORFISMOS DOS ERITRÓCITOS .....	148
III.5.2.	DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES DE <i>PLASMODIUM</i> .....	152
III.6.	ASPECTOS ÉTICOS .....	153
III.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	154
III.7.1.	ORGANIZAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS DADOS .....	154
III.7.2.	ESTIMATIVAS DE VARIABILIDADE GENÉTICA .....	159
III.7.3.	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	161

## **CAPÍTULO. 4.....163**

IV.	RESULTADOS.....	165
IV.1.	DADOS DO ESTUDO EXPLORATÓRIO.....	165
IV.2.	ESTUDO ANALÍTICO CASO-CONTROLO.....	177

<b>CAPÍTULO. 5 .....</b>	<b>189</b>
V.    DISCUSSÃO .....	191
V.1.   ESTUDO EXPLORATÓRIO .....	191
V.2.   ESTUDO DE CASO- CONTROLO .....	200
<b>CAPÍTULO. 6 .....</b>	<b>205</b>
VI.    CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	207
VI.1.   LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	209
<b>CAPÍTULO. 7 .....</b>	<b>211</b>
VII.   REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	213
<b>CAPÍTULO. 8 .....</b>	<b>235</b>
VIII. ANEXOS .....	236
LISTA DE ANEXOS .....	236

# CAPÍTULO. 1

---

## INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA



# I. INTRODUÇÃO

## I.1. História da Doença

A malária, doença milenar conhecida desde 2700 AC, despertou sempre na comunidade científica e política muitos desafios; não só na perspectiva de erradicação, como na implantação de programas de luta sustentáveis, sobretudo para os países em vias de desenvolvimento e, particularmente, os de África Subsariana (Carter & Mendis, 2002; Cunha & Cunha, 2008). A malária ou a doença que a ela se assemelhava, foi descrita há mais de 4.000 anos. De origem italiana, a palavra malária etimologicamente significa "*ar ruim*," *mal 'aria*", esta expressão presumivelmente influenciou em grande parte a história da humanidade. Consta da história (2700 AC - 340 DC), que foram descritos os sintomas característicos da malária em registos médicos antigos chineses, no Nei Ching, o Cânon de Medicina (Molineaux & Gramiccia, 1980; Sherman, 1998; Carter & Mendis, 2002; Cunha & Cunha, 2008). A descoberta das propriedades antimaláricas da quinina remonta ao século XVII, com a chegada dos missionários Jesuítas espanhóis à América do Sul. O princípio activo da quinina foi descoberto em 1632, conhecido até aos dias de hoje como o antimalárico mais potente e eficaz, particularmente para o tratamento das formas mais graves da doença (Bruce-Chwat *et al.*, 1986; Sherman, 1998; WHO, 2000a, 2000b; Mouchet *et al.*, 2004; WHO, 2010b).

A 6 de Novembro de 1880, Charles Louis Alphonse Laveran, um cirurgião do exército francês, estacionado em Constantine (Argélia), identificou um "parasita" no sangue dos pacientes com malária (Laveran, 1982). Camillo Golgi (1886), um neurofisiologista italiano, estabeleceu a diferenciação das espécies de malária ao identificar que existiam pelo menos duas formas de apresentação da doença: uma com periodicidade terçã (febre de dois em dois dias) e outra com periodicidade quartã (febre em cada terceiro dia), observou que as formas produziam números discrepantes de merozoítos (parasitas novos) e com diferentes fases de maturidade (*in* Sherman, 1998). Golgi estabeleceu também a coincidência da febre com a ruptura dos eritrócitos e libertação dos merozoítos na circulação sanguínea. Em 1890, dois investigadores italianos, Giovanni Batista Grassi e Raimondo Filetti, atribuíram, pela primeira vez,

nomes aos dois parasitas da malária que infectavam os humanos: *Plasmodium vivax* e *Plasmodium malariae*, enquanto Laveran, em 1880, acreditava que só existia uma espécie: *Oscillaria malariae*. Em 1897, um americano, William H. Welch, efectuou uma ampla revisão sobre o assunto e, atribuiu o nome de *Plasmodium falciparum* ao parasita da malária responsável pela febre terçã maligna (Cunha & Cunha, 2008). Em 1922, John William Watson Stephens, descreveu um quarto parasita causador de malária humana: *Plasmodium ovale* (Molineaux & Gramiccia, 1980; Laveran, 1982; Bruce-Chwatt, 1982,1986; Mouchet *et al.*, 2004).

Ronald Ross foi premiado com o Prémio Nobel em 1902, por ter sido o primeiro investigador a identificar o papel do mosquito na transmissão da malária. Em 1897, Ross descobriu que os parasitas da malária eram transmitidos de pessoas infectadas para os mosquitos. Esta pesquisa permitiu conhecer o ciclo esporogónico do mosquito (intervalo de tempo durante o qual o parasita se desenvolve no mosquito) (Molineaux & Gramiccia, 1980; Bruce-Chwatt, 1982,1986; Sherman, 1998; Mouchet *et al.*, 2004).

O dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) foi sintetizado em 1874, por um estudante de química, alemão, Othmer Zeidler. No entanto, a propriedade insecticida do DDT foi descoberta apenas em 1939, por Paul Müller, na Suíça. A partir desta altura e durante a II Guerra Mundial, vários exércitos utilizaram o insecticida para o tratamento dos piochos. Em finais da II Guerra Mundial, o DDT começou a ser amplamente utilizado para o controlo da malária, depois de ter sido provada por cientistas britânicos, italianos e americanos, a sua eficácia contra os vectores da doença (Bruce-Chwatt, 1982; Sherman, 1998; Mouchet *et al.*, 2004).

Os ciclos esporogónicos completos de *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. malariae* foram demonstrados, em 1898-1899, quando uma equipa de investigadores italianos que incluía Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Giovanni Batista Grassi, utilizando mosquitos *Anopheles claviger*, infectados após terem sido alimentados num paciente com malária em Roma, foram transportados para Londres onde, ao picarem dois voluntários, ambos desenvolveram malária do tipo terçã benigna (Carter & Mendis, 2002; Cunha & Cunha, 2008). Em meados do século XX, período coincidente com a ocupação militar americana de Cuba e construção do Canal de Panamá, grandes avanços foram alcançados no controlo da malária nos Estados Unidos (Molineaux & Gramiccia, 1980; Bruce-Chwatt, 1982; Sherman, 1998; Mouchet *et al.*, 2004).

A cloroquina foi descoberta em 1934, por um investigador alemão, Hans Andersag. Dados os sucessivos conflitos, ocorridos durante a II Guerra Mundial, a cloroquina só foi reconhecida como um antimalárico eficaz e seguro em 1946, pelos britânicos e americanos, mantendo a sua eficácia até 1957, altura em que foi assinalado o primeiro caso de resistência (Bruce-Chwatt, 1982,1986; Sherman, 1998).

## I.2. Esforços de Erradicação Mundial da Malária: Sucessos e Fracassos (1955-1978)

O sucesso da utilização do DDT, a eficácia dos antimaláricos sintéticos de menor toxicidade e a convicção entusiástica dos peritos levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1955, a submeter à Assembleia Mundial da Saúde uma proposta ambiciosa para a erradicação da malária. Desde essa altura, esforços de erradicação a nível mundial começaram a ser desenvolvidos e focalizaram-se na pulverização intradomiciliária com a aplicação de insecticidas residuais, uso de antimaláricos para o tratamento e prevenção da doença e medidas de vigilância epidemiológica. Essas acções desenvolviam-se em quatro etapas sucessivas: *preparação, ataque, consolidação e manutenção*. O sucesso deste programa de erradicação da OMS foi registado em algumas nações particularmente as de climas temperados e com transmissão sazonal da doença. Alguns países como a Índia e Sri Lanka obtiveram reduções significativas do número de casos, durante a implantação das medidas do programa, seguindo-se um aumento significativo dos níveis, depois dos esforços de erradicação terem cessado (Sherman, 1998; WHO, 1996a, 1999b; Carter & Mendis, 2002; Mouchet *et al.*, 2004).

Outras nações, como a Indonésia, Afeganistão, Haiti e Nicarágua, tiveram um progresso desprezível e foram excluídas completamente da campanha de erradicação, como a maioria dos países da África Subsariana. Contrariamente ao sucesso da erradicação da malária verificado na Europa e alguns países da América, Ásia e Pacífico, os problemas da malária em África eram e são, de um tipo completamente diferente dos confrontados em qualquer outro lugar do mundo (Carter & Mendis, 2002; Worrall *et al.*, 2004). As condições humanas e os factores sócio-biológicos jogam

ambos um papel preponderante na transmissão da malária em África, ressaltando sobretudo como factor principal a estabilidade e a intensidade da transmissão.

Em finais dos anos quarenta e início dos anos cinquenta, quando a OMS iniciou a planificação das campanhas globais de erradicação da malária, muitos cépticos duvidaram que até mesmo uma ferramenta tão poderosa como o DDT pudesse ter impacto significativo na erradicação da malária africana, devido à intensidade da sua transmissão (Molineaux & Gramiccia, 1980; Bruce-Chwatt, 1982,1986; Carter & Mendis, 2002; Mouchet *et al.*, 2004). Justamente por isso questionava-se se seria seguro tentar reduzir a intensidade de transmissão de malária na África tropical, com subsequente eventual perda de imunidade na população adulta e risco consequente da malária epidémica, em situações de falência das medidas de erradicação (Greenwood, 2008).

De salientar que em muitos países africanos antes dos anos cinquenta os programas de controlo nacionais eram, não obstante este cepticismo, bastante operacionais. Este entusiasmo devia-se em parte ao facto de alguns países mais próximos da África subsariana, terem conseguido alcançar índices de erradicação com consequente redução das taxas de transmissão da malária utilizando o DDT. Não obstante, ao optimismo que reinou entre os defensores da “erradicação” global da malária em África e de uma vontade política para tentar resolver o problema da endemia no continente, esta vontade na “base de erradicação” parece ter persistido até meados dos anos noventa (Sherman, 1998; Carter & Mendis, 2002). Com o desmoronar do programa de “erradicação da malária” na maioria das regiões endémicas do mundo, esta aspiração para a África inevitavelmente também desapareceu (Sherman, 1998; Carter & Mendis, 2002). Um local que é efectivamente uma parte da região africana e na qual o controlo da malária teve sucesso virtualmente até ao ponto de eliminação, foi a ilha de Madagáscar no Oceano Índico. Durante quase 20 anos (dos finais dos anos sessenta até início dos anos oitenta) a transmissão da malária esteve quase completamente suprimida. Em meados de 1986, com o declínio das medidas de controlo de erradicação, nesta ilha do Índico, verificou-se uma recrudescência dos índices de transmissão da doença, traduzidos em graves epidemias e no aumento substancial das taxas de mortalidade em todas as faixas etárias da população, não só devido à reintrodução da doença face à não sustentabilidade das medidas de erradicação, mas também, como



consequência das anteriores, que levou a uma perda da imunidade natural. Durante a era da "erradicação da malária", o continente Africano beneficiou globalmente de uma disponibilidade de fármacos antimaláricos novos, especialmente a cloroquina. Apesar da distribuição e o acesso ao tratamento serem relativamente pobres e largamente descontrolados, os efeitos durante este período foram reais e evidentes: a taxa de mortes relacionadas com malária em África neste período (dos anos cinquenta a oitenta) diminuiu. A partir dos anos oitenta, a tendência para a redução dos índices de mortalidade por malária começaram a inverter-se. Os números de mortes por malária na infância, em África, têm vindo repetidamente a subir, contribuindo para este fenómeno, a propagação da resistência à cloroquina e outros fármacos, a resistência aos insecticidas e a falta de uma vacina eficaz (Carter & Mendis, 2002; Worrall, 2004; Min-Oo & Gros, 2005; Greenwood, 2008). Actualmente o conceito de *erradicação* da doença foi abandonado, preconizando-se o de “*controlo*”.

### I.3. A Iniciativa Multilateral em Malária e a Investigação Científica em África.

A Iniciativa Multilateral em Malária [*the Multilateral Initiative on Malaria* (MIM)] foi criada em 1997, na conferência Pan-africana realizada em Dakar, Senegal, cuja visão é a sensibilização pública e internacional para o reforço das respostas em malária correspondentes ao fardo da doença, facilitando a participação Africana no desenvolvimento de intervenções de controle e tratamento eficazes (MIM, 1997; Lebakeng & Phalane, 2001; Ntoumi & Priebe, 2010). A missão da MIM é a maximização do impacto da investigação científica sobre malária através de uma colaboração global coordenada, com reforço das capacidades de pesquisa africanas, para participar no desenvolvimento das ferramentas de tratamento e controle. A MIM, tal como outras iniciativas mundiais, tem contribuído nos esforços globais para enfrentar o problema da malária, facilitando o surgimento de redes de investigação dinâmicas e de colaboração com programas de controlo de malária em África, através dos seguintes objectivos:

1. Desenvolver uma capacidade de investigação em malária, sustentável, em África, através de parcerias científicas e de treino, tanto internacional como Pan-Africanas.
2. Promover a comunicação global e cooperação entre as instituições, com vista a maximizar o impacto dos recursos e evitar a duplicação de esforços.
3. Assegurar que os resultados da investigação sejam aplicados no tratamento e controle da malária, traduzindo problemas práticos e pesquisa gerenciáveis, estimulando e facilitando desse modo o diálogo entre cientistas, profissionais de saúde pública, políticos e industriais.
4. Sensibilizar a opinião pública e internacional sobre o problema da malária – elevando desse modo o *status* da malária na agenda política, com vista à mobilização de recursos e acções de intervenção.

A 5ª Conferência Pan-Africana do Paludismo, realizada em Nairobi, em Novembro de 2009, treze anos após a fundação da MIM, fez um balanço sobre as mudanças no panorama da investigação em África, das novas oportunidades de financiamento, do lançamento e estabelecimento de novas parcerias entre a Europa, América e África e concluíram que pode ser correctamente afirmado, que o conceito actualmente da MIM “*reflecte a africanização da investigação em malária*” (Lebakeng & Phalane, 2001; Priebe, 2010; Ntoumi & Priebe, 2010).

#### I.4. Adopção de Políticas e Estratégias de Controlo da Malária

Em 1998, a OMS, em parceria com a UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância), o PNUD (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento) e o BM (Banco Mundial), lançaram um programa global, o *Roll Back Malaria* (RBM), com o objectivo ambicioso, mas não alcançado, de reduzir a morbimortalidade causada por malária em 50% até o ano 2010 (Narasimhan & Attaran, 2003; WHO/RBM, 2001). O programa RBM conta com o compromisso sólido dos sectores da saúde, entidades governamentais e não-governamentais (ONG), organismos internacionais, instituições académicas e de pesquisa, organizações privadas, organizações da sociedade civil e comunidades afectadas, para a implementação de intervenções integradas na estratégia

esboçada no Plano de Acção Global de controlo da malária. Nos últimos cinco anos algum progresso global tem sido reportado com a adopção de intervenções efectivas, que são programaticamente mais simples do que as recomendadas para o controlo do VIH e TB (Vitoria *et al.*, 2009). Medidas combinadas, integradas na estratégia do Plano de Acção Global, têm sido implementadas nos países altamente endémicos:

- a) - Acesso aprimorado aos diagnósticos, utilização da terapia combinada (multimedicamentosa), com derivados da artemisinina (*artemisinin combination therapies* - ACT), para a doença aguda, principalmente em crianças. A terapia combinada contendo artemisinina tem contribuído de modo significativo para o controlo da malária, devido ao seu efeito gametocida, impedindo a infecção do mosquito, reduzindo desse modo a transmissão da doença;
- b) - Utilização em camas de redes mosquiteiras impregnadas de insecticida de acção prolongada (*insecticide treated nets* - ITNs) (RBM/WHO, 2010a, 2010b);
- c) - Pulverização intradomiciliária com insecticidas de efeito residual. O controlo do vector tem assumido uma importância significativa na redução das taxas de morbilidade, ao promover a diminuição do contacto vector-hospedeiro vertebrado;
- d) - Tratamento intermitente preventivo (TIP) em mulheres grávidas.

## I.5. O Impacto Global do Controlo da Malária

A malária é reconhecida actualmente como uma doença e causa de pobreza, continuando a ser um problema de saúde pública mundial; responsável pela vasta maioria das mortes em África a Sul do Sahara, constituiu o maior obstáculo ao desenvolvimento social e económico dos países com alta transmissão da doença (Worrall *et al.*, 2004).

A malária é endémica em 109 países, pertencentes a diferentes regiões continentais: (África, Asia Pacífico, América e Sudoeste Asiático) (Vitoria *et al.*, 2009). De acordo com o Plano Global da OMS-RBM (WHO, 2003, 2009, 2010c), a estratégia de combate à doença deve prever a participação conjunta quer da comunidade internacional (apoando as intervenções), como dos próprios países que têm a

responsabilidade de conduzir e implementar as acções integradas de controlo. Segundo este mesmo plano, considera-se que os países individualmente estão melhor posicionados para identificar quais as acções mais apropriadas em função das populações de risco, do grau de transmissão, do nível para o qual as intervenções têm lugar e da capacidade de resposta dos sistemas de saúde. Por outro lado, a comunidade internacional joga um papel crítico, apoiando os países e provendo-os de instrumentos válidos. O programa presume que através da cooperação inter-países e parceiros internacionais poder-se-ão alcançar as metas a curto-prazo de redução da morbimortalidade entre 2010 e 2015, bem como, numa perspectiva a longo-prazo, a erradicação da malária a nível mundial (WHO, 2009; WHO, 2010c). Para serem asseguradas estas metas ambiciosas, o programa RBM definiu uma Estratégia Global com três componentes (Figura I.1):

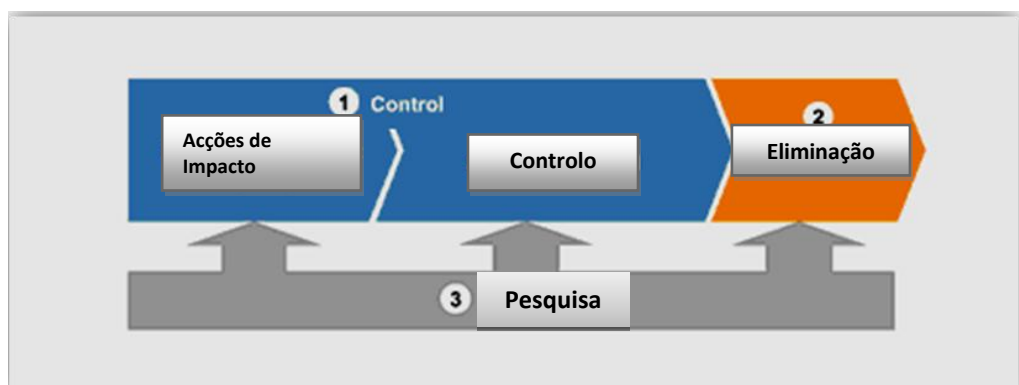
- 1) Controlo da malária;
- 2) Eliminação da malária;
- 3) Pesquisa Científica para aquisição de novas ferramentas e conhecimentos.

A OMS definiu controlo da malária como sendo a “redução do fardo da doença para níveis que deixam de constar como problema de saúde pública” (WHO, 2010c). Para Greenwood (1997) o objectivo principal dos programas de controlo é a prevenção da morbimortalidade da malária. Para se alcançar este objectivo, os programas necessitam de implementar acções com impacto, aumentando e priorizando intervenções em todas as populações de risco, com garantia de sustentabilidade ao longo do tempo. A OMS (WHO, 2007, 2008a, 2009, 2010c, 2011) definiu como objectivo primário do programa de eliminação da malária, “o fim da transmissão e eliminação do reservatório de casos infecciosos (humano e parasita), em todas as áreas geográficas de transmissão da malária, como resultado de esforços deliberados, requerendo medidas continuadas para prevenir o restabelecimento da transmissão”.

Foi em Outubro de 2007 que a OMS e os seus parceiros internacionais começaram a dar atenção às estratégias e critérios para avaliar a expansão dos programas de controlo e o progresso no sentido da eliminação da malária. Segundo os relatórios anuais do RBM e da OMS (WHO, 2009; RBM/WHO, 2010a, 2010b), alguns países estão, neste momento, empenhados no processo de eliminação da malária e outros numa fase de transição mais demorada. Em países de alta transmissão da doença,

a interrupção completa do ciclo de transmissão requererá medidas novas e adicionais de controlo. Para que os esforços das medidas de controlo e eliminação tenham êxito, será exigida aos países uma pesquisa continuada, capaz de fornecer novos instrumentos, permitir a reformulação das políticas nacionais e a melhoria da implementação das estratégias operacionais. Todos os países constituem uma parte importante da estratégia global e contribuirão para o sucesso dos objectivos mundiais para eliminação da malária. Apesar dos recursos globais não serem suficientes para apoiar todos ao mesmo tempo, adoptar-se-á como estratégia a priorização de esforços e recursos para os países onde o fardo da doença é mais elevado (WHO, 2009). A figura I.2. ilustra a categorização dos países em função do estado de controlo da malária:

Figura I.1. Componentes da estratégia do Programa Global



Fonte: Retirado e adaptado de Roll Back Malaria, Global Strategy. WHO (2009).

### **1. Países na fase de controlo, com alta contribuição para as mortes globais.**

Existem, mundialmente, 35 países que são os que contribuem com cerca de 50% de mortes totais por malária e 47% dos casos sintomáticos. Alguns destes países têm alta transmissão da malária por *P. falciparum* e estão situados na África Subsariana, dos quais se destacam: Nigéria, República Democrática do Congo, Angola, Uganda, Etiópia e Tanzânia.

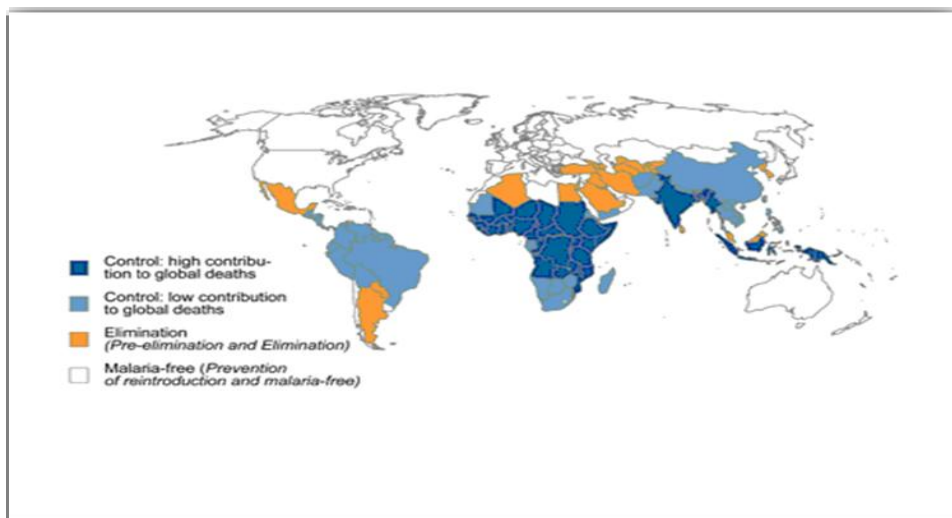
### **2. Países com baixa contribuição para as mortes globais**

Actualmente, são reportados 74 países com baixa contribuição para as mortes globais, resultantes de um fardo muito baixo da doença. Em função dos objectivos dos programas nacionais de luta anti-malária, foram identificados dois grupos principais:

a) - *Países com baixa contribuição de mortes globais na fase de controlo da malária*: Quarenta e sete países, situados na América do Sul, África e na Ásia-Pacífico, têm reportado um menor número de mortes globais e casos atribuíveis a malária. Nestes países o objectivo dos programas nacionais é a redução das taxas de transmissão da malária por *P. falciparum* e *P. vivax*;

b) - *Países com baixa contribuição de mortes globais na fase de eliminação da malária*: Vinte e sete países, situados na região Mediterrânea Oriental, no Norte de África, nas Américas e no Pacífico Ocidental, têm níveis muito baixos de transmissão da malária e encontram-se actualmente em várias etapas de eliminação segundo relatório da OMS (WHO, 2008, 2009, 2010c).

Figura I.2. Categorização de países em função do estado de controlo da malária



Fonte: Retirado de World Malaria Report.WHO (2008).

## I.6. Estimativas Globais de Casos e Mortes por Malária (2009-2010)

A malária continua a ser o principal desafio para a saúde pública e desenvolvimento sustentável em África. Estima-se que três biliões de pessoas vivem nos 109 países onde a malária é endémica (WHO, 2009; 2010c, 2011; Vitoria *et al.*, 2009), causando 234 milhões de episódios clínicos da doença em cada ano, sendo *P. falciparum* o responsável por 90% dos casos. Anualmente são registadas pelo menos 863.000 mortes associadas à doença, das quais 91% acontecem na África subsariana,

onde a malária é a principal causa de morbimortalidade em crianças menores de cinco anos e em mulheres grávidas. Segundo os dados da OMS/RBM (WHO, 2009, 2010c; RBM/WHO, 2010a, 2010b), a malária é a primeira causa de morbimortalidade nos países onde os níveis de endemicidade variam entre hipo e mesoendemicidade, movendo-se actualmente do 6º para o 1º lugar no *ranking* das causas de mortalidade infantil. Constituindo cerca de 10% do fardo de doença global, a malária contribui para uma tensão significativa nos sistemas de saúde com elevadas perdas de produção, sendo estimada uma despesa anual em África de aproximadamente 12 bilhões de dólares norte-americanos. Além disso, a malária consome cerca de um quarto das rendas das famílias na maioria dos países endémicos africanos, reduzindo desse modo o acesso a intervenções preventivas e aos serviços de saúde. Para além do impacto directo da malária na saúde das populações, contribui também para um peso socioeconómico incalculável nas comunidades (particularmente para os segmentos populacionais mais pobres e mais vulneráveis) e nas economias dos países em geral. O fardo da malária nos países africanos a sul da Sahara traduz-se em elevadas perdas económicas, altas taxas de absentismo escolar e uma fraca produtividade agrícola, principal meio de subsistência da maioria da população rural, agravando assim consideravelmente a pobreza já extremada desses países (Worrall *et al.*, 2004; WHO, 2009, 2010c; RBM/WHO, 2010a, 2010b).

## I.7. Avaliação do Impacto das Intervenções de Malária na Região Africana

O Dia Mundial da Malária, comemorado a 25 de Abril, representa uma oportunidade para toda a sociedade (instituições públicas, privadas, de caridade, científicas e comunidade em geral) ser chamada a participar de modo unificado no esforço global de redução dos casos e mortes por malária (WHO/RBM, 2001; WHO, 2003). O alcance dos objectivos preconizados neste grande desafio proverá os países endémicos de ganhos múltiplos: benefícios económicos e epidemiológicos no sector da saúde, assim como a promoção do desenvolvimento humano. Segundo o relatório do RBM (WHO, 2010c), os estados membros da Organização das Nações Unidas (ONU) reafirmaram e reconheceram, mais uma vez, que só poderão alcançar as metas por Objectivos de Desenvolvimento do Milénio (ODMs), se for reduzido o impacto da

malária-doença nas suas regiões e com consequente recanalização dos esforços para melhoria do acesso à educação, melhoria dos planos de saúde da mulher e da criança e da redução da extrema pobreza.

A 25 de Abril de 2010, o Secretário-geral da ONU - Ban Ki-Moon, considerou estarmos num momento crítico e chamou a atenção da comunidade internacional para a malária, por faltar menos de um ano para se alcançar o objectivo preconizado pelo RBM em 1998 (reduzir a morbimortalidade causada por malária em 50%).

De acordo com as recentes estimativas, mais de um terço dos 109 países endémicos (9 Africanos e 29 fora de África), documentaram a redução de casos de malária em pelo menos 50% em 2008, quando comparadas com 2000 (Hay & Snow, 2006; Hay *et al.*, 2009; Crawley *et al.*, 2010). Os países que alcançaram altas taxas de cobertura da implantação das acções integradas (ACT, ITNs, pulverização intradomiciliária com insecticidas de efeito residual e TIP em mulheres grávidas), registaram uma redução de casos e de mortes devido a malária em 50%, sugerindo-se que poderão ser alcançadas as metas por ODMs se existir uma cobertura adequada das intervenções fundamentais (Vitoria *et al.*, 2009; Crawley *et al.*, 2010). Estes resultados foram observados em alguns países, nomeadamente São Tomé e Príncipe, Zanzibar e República Unida da Tanzânia. Resultados similares foram também registados em outros países do continente africano, incluindo a Eritreia, o Ruanda e a Zâmbia (O'Meara *et al.*, 2010).

Há evidência de que a redução para 50% do número de casos e de mortes reportados traduziram o declínio das taxas de morbimortalidade verificadas em crianças menores de cinco anos, advogando-se que esforços intensivos do controlo da malária podem ajudar muitos países africanos a alcançar as metas por ODMs e antes de 2015 atingirem uma redução para dois terços nas taxas de mortalidade infantil (WHO, 2009, 2010c, 2011; Owusu-Agyei *et al.*, 2009). Apesar dos progressos globais registados (Tanser, 2003), persistem no entanto grandes ameaças à saúde em geral, exacerbadas pela propagação da resistência aos insecticidas usados no controlo do vector, problemática da fármaco-resistência parasitária e ausência de uma vacina eficaz (Min-Oo & Gros, 2005).



## I.8. Malária em Angola

### I.8.1. Caracterização do País

Angola é um país localizado na região ocidental da África Austral, a Sul do Equador, entre os paralelos 4° 22' (incluindo a província de Cabinda) e 18° 02' de latitude sul e 11° 50' de longitude este. A extensão da costa marítima é de 1.650 km e a terrestre de 4.834 km, dos quais 2.395 km com a República Democrática do Congo, 1.861 km com a Namíbia, 1.010 km com a Zâmbia e 168 km com a República do Congo. [Instituto de Investigação Agronómica de Angola (IIAA) s/data]. É o quinto país de maior dimensão na África Subsariana, com uma superfície de 1.246.700 km<sup>2</sup>. Do planalto central (províncias do Huambo e Bié) irradia para todas direcções uma grande rede hidrográfica, de grande potencial energético, cinegético e turístico, ocupando cerca de 60% do território, e que integra para além de outras de menor dimensão, no norte e nordeste a bacia hidrográfica do maior rio da África Ocidental, o Zaire ou Congo (4.000 quilómetros), a leste a bacia hidrográfica do maior rio da África Oriental, o Zambeze (2.680 quilómetros), no centro a bacia hidrográfica do Cuanza (960 quilómetros), e a Sul as bacias hidrográficas dos rios Cunene (945 quilómetros), Cubango (Okavango) (975 quilómetros) e Cuando (735 quilómetros) (IIAA s/data).

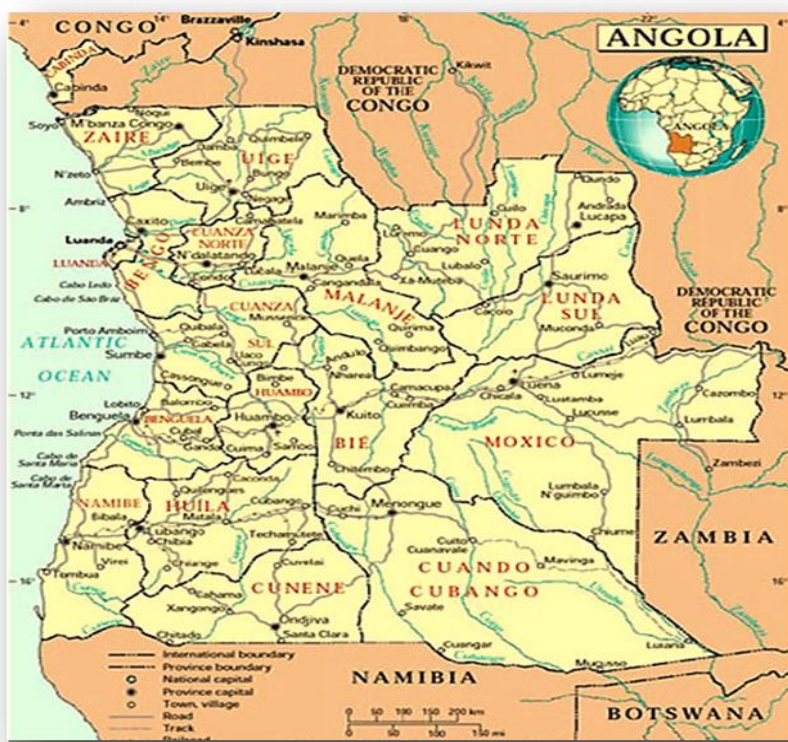
Cerca de 63% do território de Angola é formado por um planalto coberto de savanas, estando situado numa altitude entre os 1.000 e os 1.600 metros. O ponto mais alto situa-se na região central: Província do Huambo – Morro do Môco (2.620 metros). Entre a zona planáltica e a faixa litoral (103.523 km<sup>2</sup>), destaca-se a zona de transição para o interior (93.652 km<sup>2</sup>) que, na região sul, se individualiza da região planáltica por uma cadeia marginal de montanhas (25.108 km<sup>2</sup>). Os parques e reservas naturais ocupam uma área superior a sete mil hectares (IIAA s/data).

A nível climático, diferencia-se a zona tropical seca, ao longo da faixa litoral e sul do país e que na província do Namibe se assume como tropical desértico e inclui o deserto do Namibe; a zona tropical húmida que envolve a maior parte da região do interior a norte do paralelo 12° e a restante área planáltica, a sul do paralelo 12°, que é modificada pela altitude. Duas distintas estações por ano podem ser esquematizadas: o

cacimbo, caracterizado por um tempo frio e seco (Maio a Agosto) e a estação das chuvas, quente e húmida (Setembro a Abril). A diversidade morfológica, geológica, climatológica, de vegetação e pedológica, condicionaram a individualização de 16 regiões naturais em Angola (Dinis & Aguiar, 1969).

O País, cuja capital é Luanda, está administrativamente dividido em 18 províncias: (Bengo, Benguela, Bié, Cabinda, Cuando Cubango, Cuanza-Norte, Cuanza-Sul, Cunene, Huambo, Huíla, Luanda, Lunda-Norte, Lunda-Sul, Malange, Moxico, Namibe, Uíge, Zaire), 164 municípios e 557 comunas (Figura I.3).

Figura I.3. Mapa de Angola



Fonte: Retirado de Atlas Geográfico. Ministério de Educação Angola (1982).

### I.8.1.1. Características Antropológicas da População

A população de Angola é composta por um amplo mosaico etnográfico e cultural, maioritariamente de origem Bantu, havendo contudo pequenas comunidades dos povos San - os primeiros povoadores do território que se encontram dispersos em pequenos grupos nas províncias do Cunene, Huíla, Moxico e Cuando-Cubango. Apesar da diversidade étnica e da variabilidade dos fenótipos entre os povos Bantu de Angola, estes mantêm laços culturais fortes entre si, constituindo-se em espaços sócio-culturais com alguma homogeneidade histórica e cultural. Os principais grupos etnolinguísticos são: Bakongo, Kimbundu, Ovimbundu, Lunda-Cokwe, Nganguela, Nyaneka Nkumbe, Hereros e Ambós (Redinha, 1975).

**Bakongos** – São agricultores tradicionais, praticam agricultura artesanal de subsistência, possuem contudo alguma propensão para o comércio, com destaque para os povos de Cabinda e os Zombos.

**Kimbundus** – Estes povos ocupam uma vasta extensão do território entre o mar e o rio Cuango. São conhecidos na história pela capacidade em formar estados soberanos (Ndongo e Matamba). Os povos Kimbundu praticam igualmente a agricultura de culturas ricas, com destaque para o café.

**Lunda-Cokwe** – Ocupam uma área extensa do território angolano. Oriundos da África Central, sofreram o domínio do estado dos Lunda na Katanga Ocidental. Povo oriundo duma velha cultura de caçadores domina com perfeição as técnicas siderúrgicas.

**Ovimbundu** – Chamados “o povo do nevoeiro”. Este grupo ocupa uma vasta extensão do território angolano sublevando das terras litorâneas às terras altas, e constituindo-se como o grupo mais numeroso. Com forte vocação migratória, espalharam-se desde a costa ocidental (Benguela) para além da bacia do Zambeze. A sua tendência tem sido a de assimilar outros grupos. Do ponto de vista artístico, mantiveram uma escola de escultura animalística de elevado mérito.

**Nganguela** – Este povo encontra-se dividido em dois domínios territoriais, devido à migração do grupo Cokwe para o sul, situando-se um deles na fronteira leste, desde a bacia do Zambeze ao curso do Cuango e outro na região superior do Cubango.

Originários de antigas populações de caçadores, praticam actualmente agricultura de subsistência principalmente na região oriental.

**Nyaneka-Khumbe** – Este grupo encontra-se estabelecido nos territórios ao longo do curso do rio Cunene. É formado por populações criadoras de gado. Culturalmente revelam semelhança aos povos Ambós e dos Hereros. Historicamente têm grande influência da cultura camítica oriental levada até ao Cunene pelas migrações dos pastores camíticos do Nordeste Africano.

**Hereros** – É constituído por criadores de gado. O grupo mais referenciado entre os Herero é o Kuvale. As suas origens apontam para o nordeste africano. Admite-se que o povo Herero tenha tido uma cultura camítica oriental quase pura.

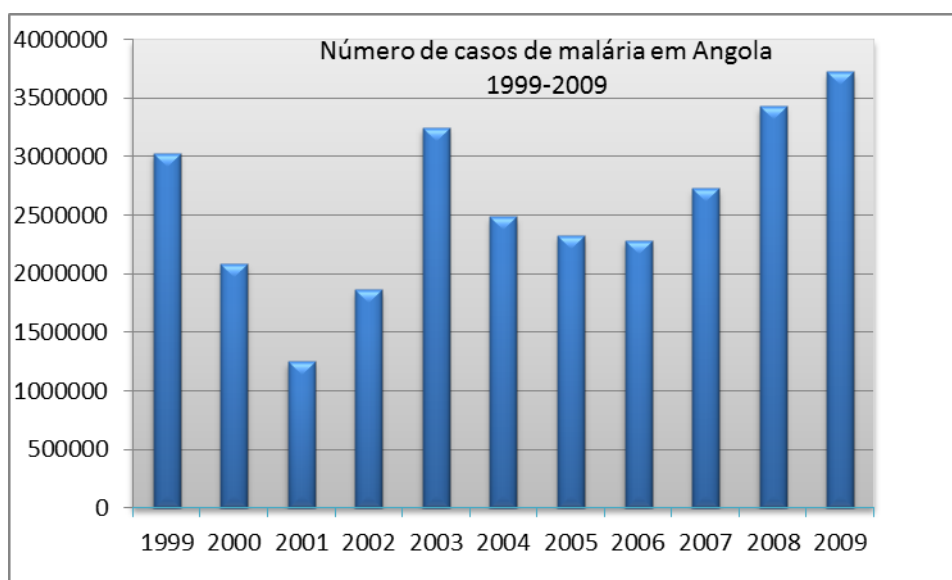
**Ambós** – Este grupo ocupa também um vasto espaço do território a meio da fronteira sul, destacando-se os subgrupos Kuanhamas, Kuamatos e Ombandja. Os Kuanhamas tornaram-se célebres pelo seu nível de organização militar. Desenvolvem actividade agro-pecuária que mantém actualmente. O carácter dos Kuanhamas define-os como corajosos, dotados de espírito altivo e revelam nas suas linhas somáticas alguns traços camitóides.

#### I.8.1.2. Perfil Epidemiológico

O perfil epidemiológico é dominado por doenças infecciosas e parasitárias: malária, doenças diarreicas agudas, doenças respiratórias agudas, tripanossomíase e doenças imunopreveníveis, tais como o sarampo e o tétano. Em Angola, a malária continua a ser um grave problema de saúde pública, agravado pelos 30 anos de guerra civil, que constituíram um sério obstáculo à cobertura sanitária e à implementação de medidas de controlo eficazes. Todo o país é endémico e persistem três estratos epidemiológicos (*hiperendemia, mesoendemia estável e mesoendemia instável*) (Tabela I.1) [(Programa Nacional de Controlo da Malária (PNCM), 2006; Ministério da Saúde da República de Angola (MINSA), 2009)]. Este conhecimento é baseado, essencialmente, em estudos de prevalência da infecção plasmodial assintomática, através de exames parasitológicos utilizando a microscopia óptica. A espécie *P. falciparum* é o parasita dominante, apresentando uma prevalência de 92%, (Webster,

2001; PNCM, 2006) seguido por *P. vivax* com 7% e *P. malariae* com 1%. A presença de infecções por *P. ovale*, embora não descritas nos relatórios oficiais de Angola, foram inequivocamente reportados, em 2007, num estudo realizado em crianças do Hospital Pediátrico de Luanda, utilizando a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase) (Miranda *et al.*, 2007). Não existem registos oficiais sobre a prevalência de co-ocorrência de mais de uma espécie de *Plasmodium* no hospedeiro humano no país até ao início do actual estudo (Webster, 2001; PNCM, 2006; MINSA, 2009). O complexo *Anopheles gambiae* e *Anopheles funestus* são os principais vectores implicados na transmissão. Os dados estatísticos demonstram que a intensidade da transmissão aumentou a partir de 1974, estimando-se que existam anualmente cerca de três milhões de casos clínicos (PNCM, 2006; 2009). Apesar das medidas sanitárias de controlo da epidemia, da vigilância epidemiológica e da melhoria dos indicadores de cobertura sanitária, no período pós-guerra, continua-se a verificar um aumento do número de casos, justificados a partir de 2006, pela melhoria do sistema de informação e consequentemente pelo aumento do número de notificações (Figura I.4) (Fortes, 2011).

Figura I.4. Morbilidade por malária em Angola de 1999-2009



Fonte: Retirado e adaptado de PNCM (2009); Fortes (2011).

Em 2007, foram notificados pelo PNCM mais de 2,5 milhões de casos clínicos, tendo sido a malária responsável por mais de 50% das consultas, 20% da mortalidade

materna e uma taxa de mortalidade bruta de 4,1% (MINSA, 2009). Em 2008 foram notificados, 3.428.567 de casos, com aproximadamente 9.710 óbitos. Em 2009 foram notificados 3.726.606 casos sintomáticos de malária e 10.505 óbitos (Figura I.4) (Fortes, 2011). Desde 2005, de acordo com as recomendações da OMS, novas estratégias de combate à doença foram implantadas pelo PNCM, destacando-se: tratamento baseado nas combinações (ACT), tratamento intermitente e preventivo da mulher grávida com sulfadoxina+pirimetamina, prevenção do contacto com o vector através do uso de redes mosquiteiras tratadas com insecticidas e luta antivectorial selectiva (PNCM, 2009). A partir de 2006, com a introdução das combinações terapêuticas à base de artemisinina (arteméter+lumefantrina), verificou-se a estabilização da mortalidade por malária no país, traduzida pela tendência regressiva da letalidade (Fortes, 2011).

Tabela I.1. Estratificação epidemiológica da malária em Angola

Nível de Endemicidade	Províncias	Principais Vectores	Parasita	% População afectada	Período de transmissão
Hiperendémica	Cabinda Uíge C. Norte Malange Lunda Norte Lunda Sul	<i>An. funestus</i> <i>An. gambiae</i> <i>An. nili</i> <i>An. ziemani</i>	<i>P. falciparum</i> (89%) <i>P. vivax</i> (7%)	28%	Todo o ano Alta transmissão de Novembro a Janeiro
Mesoendémica Estável	Zaire Luanda Bengo Benguela Cuanza Sul Huambo Bié	<i>An. gambiae</i> <i>An. funestus</i> <i>An. ziemani</i> <i>An. nili</i> <i>An. obscurus</i>	<i>P. falciparum</i> (93%) <i>P. vivax</i> (7%)	55%	Alta transmissão de Novembro a Maio  Baixa transmissão de Julho a Outubro
Mesoendémica Instável	Moxico C. Cubango Cunene Huíla Namibe	<i>An. gambiae</i> <i>An. funestus</i> <i>An. rhodesiensis</i>	<i>P. falciparum</i> (93%) <i>P. vivax</i> (7%) <i>P. malariae</i> (5%)	17%	Baixa transmissão de Maio a Dezembro

Fonte: Retirado e adaptado de PNCM (2006); COSEP (2007); Fortes (2011).

## I.8.2. Histórico da Malária em Angola

Fortes (2011), no âmbito da sua dissertação de doutoramento, efectuou e apresentou um levantamento histórico da malária em Angola [pp 33-37] do qual se destacam aqui, apenas, os marcos que consideramos mais relevantes: A malária é conhecida em Angola desde a antiguidade, contudo os primeiros registos datam de 1923, altura da realização do 1º Congresso de Medicina Tropical da África Ocidental, realizado em Luanda, onde a malária em Angola ocupa um lugar de destaque (Cambournac *et al.*, 1955a).

1942 - 1952 - É proposta a estratificação de Angola em três zonas:

- Zona equatorial, englobando a região de Cabinda e dos Bakongos com alta transmissão durante todo ano;
- Zona Tropical, estendendo-se da bacia do Congo até a província de Benguela;
- Zona Subtropical, correspondente à região sul do país (tendo em conta a influência climática da Namíbia e do Kalahari) (Cambournac *et al.*, 1955b, 1955c)

1955 - 1958 - Cambournac (1955b) aproveitou a presença da Missão de Prospeção de Endemias em Angola que deveria fazer o estudo da incidência e da distribuição da febre-amarela, para ao mesmo tempo fazer o primeiro inquérito sobre malária em Angola, realizado em todo o território com excepção de Capelongo, Mulondo e Vila Salazar. Diversos estudos reportavam a existência, na época, de diferenças de prevalência entre as localidades – na província do Bié a prevalência entre as localidades variava de 5% a 80%. Inquéritos efectuados revelaram na época uma situação de transmissão esporádica para a localidade do Lobito e de hipoendemia para a cidade de Luanda. O parasita dominante era *P. falciparum* e a população vectorial tinha a seguinte distribuição:

- a) Complexo *Anopheles gambiae* com predomínio da espécie *An. gambiae* em toda a parte setentrional, *An. melas* no Lobito e *An. arabiensis* no sul. *An. melas* na época terá sido igualmente dominante em Luanda;

- b) *An. funestus* encontra-se igualmente descrito nos documentos da época juntamente com o *An. nili* como vectores dominantes, com referências a *An. pharoensis* como vector secundário.

Os portugueses ensaiavam pela primeira vez a aplicação de insecticidas residuais numa região bastante limitada no sul de Angola (Cambournac *et al.*, 1955b, 1955c, 1956a, 1956b).

1960 - 1970 - Foi elaborado um projecto com o objectivo de organizar equipas de luta contra a malária nas principais cidades e implementado um projecto-piloto de erradicação da malária na província de Benguela (centro-sul) com a duração de três anos.

1975 - 1985 - É proposta a criação do serviço de luta contra a malária a nível nacional, acção que deveria contar com o apoio da OMS. Esta situação não é concretizada, devido à ascensão de Angola à independência. Somente em 1984, com o apoio da OMS, inicia-se a implementação do PNCM e realiza-se o primeiro estudo *in vivo* e *in vitro* de resistência de *P. falciparum* à cloroquina (Dias, 1985).

1992 - 1999 - Angola subscreve a Declaração de Amesterdão que orienta a nova estratégia mundial. Em 1997 realiza-se a Cimeira dos Chefes de Estado da Organização de Unidade Africana (OUA). Angola subscreve a Iniciativa Africana de Aceleração da Luta Contra o Paludismo e associa-se à Iniciativa Africana Contra o Paludismo no século XXI. Com o apoio da UNICEF, foi realizado o primeiro estudo específico sobre conhecimentos, atitudes e práticas (CAP) em relação à malária, na comuna da Funda, província do Bengo. Este estudo serviu de base à introdução do uso de redes mosquiteiras tratadas com insecticida, numa iniciativa piloto que se foi generalizando nos anos seguintes a todas as províncias do país através da criação de Unidades de Tratamento com Insecticida (UTIS).

1999 - 2002 - Angola subscreveu, em Moçambique, a Iniciativa Mundial RBM, tendo em 2000, no encontro dos Chefes de Estado dos Governos africanos, realizado na República Federal da Nigéria, subscrito a Declaração de Abuja que resume a iniciativa RBM. Em 2001 o Governo angolano disponibilizou o primeiro orçamento específico para um Programa Nacional Integrado de Combate às Grandes Endemias, sendo a malária uma das prioridades, criando em 2002 uma Comissão Nacional de Combate ao VIH/SIDA, Malária e Tuberculose.



2003 - 2006 - Angola beneficia de financiamento do Fundo Global criado para o Combate à Malária, VIH/SIDA e Tuberculose, tendo sido reforçado, em 2005, por um financiamento complementar atribuído pelo Presidente dos E.U.A. George W. Bush e pelo Banco Mundial. Em 2006, é definida nova política de tratamento dos casos não graves de malária, com a introdução das combinações terapêuticas à base de artemisinina (ACTs) (Fundo Global de Luta Contra a AIDS, Tuberculose e Malária, 2009).

## II. EPIDEMIOLOGIA DA MALÁRIA

*Malaria is..... a thousand different diseases and epidemiological puzzles. Like chess, it is played with a few pieces, but is capable of an infinite variety of situations.*

Hackett L: *Malaria in Europe, an ecological study*, 1937

### II.1. Introdução

A malária, uma das doenças infecciosas humanas mais prevalentes, continua a ser a mais devastadora. Com o VIH e a tuberculose são consideradas, no seu conjunto, as doenças mais mortais nas regiões tropicais e subtropicais (Barry, 2005; Vitoria *et al.*, 2009; WHO, 2010b, 2010c, 2011).

O conhecimento da epidemiologia da malária é essencial para a concepção e interpretação dos resultados dos ensaios com medicamentos, vacinas ou outras intervenções (Owusu-Agyei *et al.*, 2009). A informação requerida inclui dados sobre a prevalência de parasitas e suas características genéticas, a dinâmica da infecção, a intensidade de transmissão, natureza, comportamento e características genéticas dos vectores, variabilidade antigénica do hospedeiro humano e informações sobre os padrões de morbimortalidade por malária (Barry, 2005; Owusu-Agyei *et al.*, 2009). O homem, o parasita e o mosquito, são os três elementos de um ciclo interactivo e as suas acções recíprocas desenvolvem-se em condições climatéricas e ecológicas específicas para as diferentes espécies de parasitas e vectores. Este trinómio homem/parasita/vector constitui, segundo uma expressão muito antiga, descrita por Sore (1943) (*in* Mouchet *et al.*, 2004) o “*complexo patogénico do paludismo*” (Mouchet *et al.*, 2004). Este complexo evolui segundo as condições do meio ambiente naturais ou antrópicas (desflorestação, irrigação, urbanização, etc.), do clima (temperatura, pluviometria), das operações de luta antipalúdica, das migrações da população, das alterações da fauna anofelínica e, provavelmente, em função de outras determinantes secundárias. Esta evolução pode fazer-se quer no sentido do aumento da malária, em um determinado lugar ou a situação inversa (redução da infecção/doença) (Mouchet *et al.*, 2004; Mayor *et al.*, 2007). Alguns relatos fazem referência às condições fundamentais ao desenvolvimento do *paludismo autóctone* ou *malária nativa* (Mouchet *et al.*, 2004) e

apontam como requisitos necessários ao progresso da referida *malária nativa* (Mouchet *et al.*, 2004) numa determinada região, os seguintes:

- a) Presença de espécies anofelínicas geneticamente aptas a assegurar o ciclo do *Plasmodium*;
- b) Criadouros larvares produtivos de espécies em número suficiente para manter um fluxo de picadas aos habitantes (densidade crítica);
- c) *Anopheles* antropófilos capazes de sobreviver durante o tempo necessário, nas condições climáticas locais, para completar o ciclo esporogónico dos parasitas;
- d) Humanos portadores de gametócitos infectantes.

A transmissão de parasitas do género *Plasmodium* pelo vector anofelino é um factor crucial que determina a epidemiologia da malária em áreas endémicas (Richie, 1988; Greenwood, 1997; Arez *et al.*, 2003). Uma melhor compreensão da dinâmica de transmissão proporcionaria novas perspectivas na planificação e avaliação do impacto das estratégias de controlo actual e futuras. Uma característica fundamental na epidemiologia da malária humana é a diversidade parasitária em termos de espécies ou dentro das populações de espécies (genótipos diferentes) (Sutherland *et al.*, 2010). Em áreas endémicas a co-ocorrência de mais de uma espécie ou (genótipos) em populações humanas e vectoriais é um achado comum (Richie, 1988; Greenwood, 1997; Barry, 2005). O resultado de tais interações sobre a doença tem sido nas últimas décadas o centro de interesse de muitos trabalhos: investigar como os distintos mecanismos estão relacionados e como os diferentes agentes interagem, durante o ciclo de vida do *Plasmodium* (Richie, 1988; Arez *et al.*, 2003). A grande variabilidade da distribuição da malária a nível mundial depende da capacidade dos vectores, dos parasitas e dos hospedeiros vertebrados. Aponta-se, como importante factor limitante da propagação da doença no mundo, o vector. Este, como hospedeiro definitivo, assegura a reprodução sexuada do parasita, para além de manter a transmissão de homem a homem sendo, por isso, o principal “pivô” da epidemiologia da malária (Richie, 1988; Greenwood, 1997; Mouchet *et al.*, 2004; Barry, 2005). A ausência de malária nas ilhas Maurícias e Reunião até à implantação do mosquito *Anopheles* entre 1860 e 1870 constituem um exemplo particularmente demonstrativo do papel crucial do vector (Mouchet *et al.*, 2004).

## II.2. Malária Estável e Instável

O conceito de *estabilidade* versus *instabilidade* foi introduzido por Macdonald (1957), baseado em sete parâmetros, sumarizados na Tabela II.1 (*in* Bruce-Chwatt, 1982; Mouchet *et al.*, 2004).

Tabela II.1. Classificação da malária em função da estabilidade (pós Bruce-Chwatt, 1980)

Características	Malária instável	Malária estável
Endemicidade	Habitualmente fraca/moderada. Pode existir localmente uma forte endemicidade.	Habitualmente muito forte. Pode existir uma moderada endemicidade.
Causa determinante	Vector pouco antropófilo e de pouca longevidade. Estação curta de transmissão.	Vector muito antropófilo, longevidade moderada ou longa, Estação longa de transmissão.
Densidade crítica anofelínica elevada	(1-10 ou mais picadas/homem /noite).	Pode ser muito baixa (<1 picada /homem/noite).
Variantes sazonais	Pronunciadas.	Não muito pronunciadas salvo por curtas estações secas.
Incidência do parasita	Flutuações muito marcadas de um ano ao outro. <i>P. vivax</i> o mais frequente.	Pouco marcada, fora das flutuações sazonais. <i>P. falciparum</i> o mais frequente.
Imunidade da população	Muito variável devido às flutuações inter-anuais. Muito fraca em determinados grupos.	Forte. Algumas variações de acordo com as localidades.
Epidemias	Frequentes, em função do clima.	Muito improváveis.

Fonte : Retirado e adaptado de Biodiversité du paludisme dans le monde. Mouchet et al.(2004).

Segundo Macdonald (1957) (*in* Mouchet *et al.*, 2004), a endemicidade da malária pode ser categorizada em três tipos: *malária endêmica estável*, *malária endêmica instável* e *malária epidêmica*. A *malária endêmica estável* ocorre em muitas regiões da África Subariana, em algumas regiões do norte da Índia, Indonésia e da América do Sul. O termo é utilizado quando a doença é endêmica, com uma transmissão constante de ano para ano, sendo as epidemias incomuns. Nestas regiões os vectores principais da malária são antropófilos (i.e. alimentam-se preferencialmente em humanos), têm uma elevada taxa de sobrevivência, a transmissão é eficiente, com taxas muito altas para a maioria das pessoas que experimentam anualmente picadas infecciosas (Bruce-Chwatt, 1982; Mouchet *et al.*, 2004).

As formas de doença mais graves e mortais acontecem principalmente entre "*os recém-chegados*", i.e. crianças e imigrantes não-imunes. Os habitantes mais velhos sobrevivem às infecções múltiplas, mantendo um grau de imunidade como resultado das reinfecções repetidas, que conferem uma relativa protecção às formas mais graves de doença (Molineaux & Gramiccia, 1980; Bruce-Chwatt, 1982; Richie, 1988; Mouchet *et al.*, 2004).

Quanto à *malária endémica instável*, tem sido descrita em regiões do sul da Índia, Sudeste Asiático, América Central e do Sul. Nestas regiões, contrariamente às *regiões estáveis*, o potencial para o surgimento das epidemias é muito alto. A doença também é endémica mas o termo instável é aplicável porque a transmissão varia grandemente, de ano para ano. Nestas regiões os anofelíneos são, predominantemente, zoofílicos (i.e. alimentam-se em animais), as taxas de sobrevivência da população vectorial são baixas e, em geral, a transmissão é ineficaz, requerendo altas populações vectoriais. Nestes casos, a imunidade da população é muito flutuante em consequência da irregularidade da intensidade de transmissão, das baixas taxas de inoculação entomológicas e dos longos intervalos entre as inoculações, que em regra podem ser superiores a um ano (Bruce-Chwatt, 1982; Molineaux, 1988; Richie, 1988; Mouchet *et al.*, 2004).

O terceiro tipo de endemicidade é a *malária epidémica*. Esta é uma forma extrema de *malária instável*, que acontece quando uma população ou até mesmo um pequeno grupo de indivíduos estão sujeitos a um aumento da intensidade de transmissão, associado a taxas de inoculação acima do previamente ou normalmente experimentado. As epidemias podem ocorrer após vários anos de relativa baixa de transmissão da doença, durante a qual ocorre um declínio da imunidade global da população. Os factores precipitantes de tais epidemias são, frequentemente, difíceis de identificar. A doença pode surgir de repente, sem nenhum factor aparente e desaparecer novamente sem causa óbvia. Na prática, os surtos epidémicos podem ser uma catástrofe, particularmente se a espécie *P. falciparum* estiver envolvida, porque nestas situações as formas mais graves da doença não se restringem aos "*recém-chegados*" mas a toda a população, incluindo os mais velhos, cuja imunidade global em relação à doença sofreu um declínio durante o período de baixa transmissão (Bruce-Chwatt, 1982; Mouchet *et al.*, 2004; Worrall *et al.*, 2004).

### II.3. Classificação da Endemia Malárica

A epidemiologia da malária é muito complexa e pode apresentar variações consideráveis, até mesmo dentro de áreas geográficas relativamente pequenas. O grau de endemicidade foi tradicionalmente definido pela OMS, em função das taxas de parasitemia e do índice esplénico (escala de Hackett) (WHO, 1994; Greenwood, 1997; Mouchet *et al.*, 2004), avaliado em crianças entre os dois e nove anos de idade. De acordo com a OMS (1964), citado por Mouchet *et al.* (2004), as zonas endémicas têm a seguinte classificação: zonas hipoendémicas, aquelas cujo índice esplénico é inferior a <10%; mesoendémicas, zonas em que o índice esplénico varia entre 11% e 50%; hiperendémicas, zonas com índice entre 51% a 75% e holoendémicas, aquelas em que os índices esplénicos são superiores a 75% (Snow *et al.*, 1997; White, 2003; Mouchet *et al.*, 2004; Snow *et al.*, 2005) (Tabela II.2 e Figura II.1).

Tabela II.2. Classificação das zonas de endemia

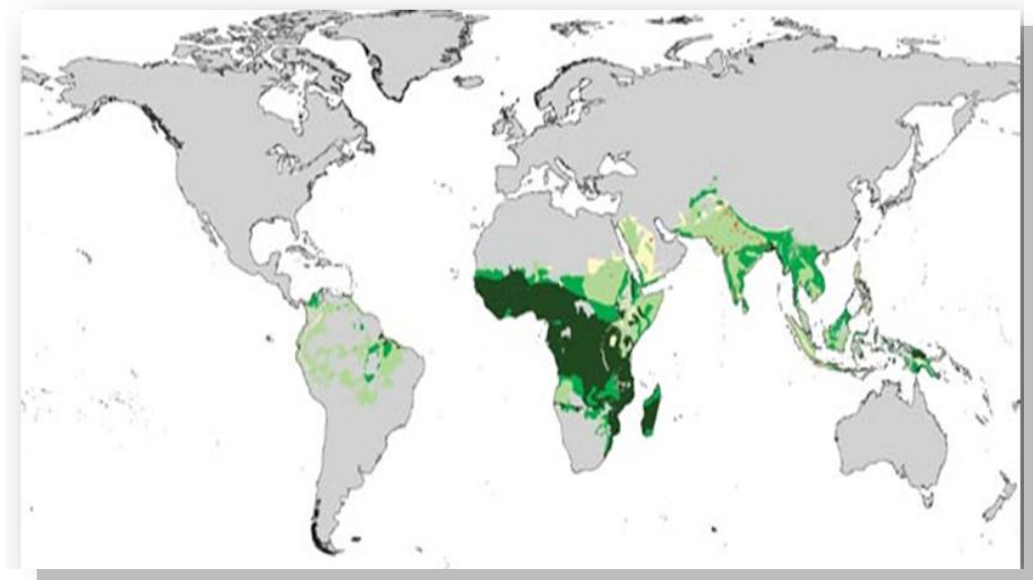
	Holoendémica	Hiperendémica	Meso-endémica	Hipoendémica e epidémica
<b>Índice esplénico (Kampala, 1950)</b>	Sempre >75%, redução da esplenomegalia a partir dos 10 anos	Sempre >50%, em crianças com idade entre os 2 e 9 anos	Entre 11 a 50% em crianças com idade entre os 2 e 9 anos	Menor de 10% em crianças com idade entre os 2 e 9 anos
<b>Índice parasitário (Yaoundé, 1962)</b>	Sempre >75%, em crianças dos 6 meses aos 11 anos; diminuição da densidade parasitária dos 2 aos 9 anos e mais lentamente acima dos 10 anos	Sempre > 50%, em crianças com idade entre os 2 e 9 anos	Entre 11 a 50% em crianças com idade entre os 2 e 9 anos	Menor de 10% em crianças com idade entre os 2 e 9 anos. Pode aumentar em algumas épocas sazonais e em situação de epidemias.

Fonte : Retirado e adaptado de Biodiversité du paludisme dans le monde.Mouchet et al. (2004).

Contudo, em regiões endémicas continua a ser pouco comum a utilização destes indicadores para a planificação dos programas de controlo. Em áreas holo e hiperendémicas (como por exemplo, certas regiões de África tropical e da Nova Guiné), onde há intensa transmissão de *P. falciparum*, as pessoas podem ser inoculadas com mais de uma picada do mosquito infectado por dia e várias vezes ao longo das suas





vidas. Nestas regiões as taxas de morbilidade e de mortalidade devido a malária são consideráveis, sobretudo durante a infância. A intensidade da transmissão permite o desenvolvimento de uma imunidade contra a doença duradoira e forte (Richie, 1988; Snow *et al.*, 1997; White, 2003; Mouchet *et al.*, 2004; Snow *et al.*, 2005), apesar do fardo da doença ser muito alto em crianças e jovens e a maioria das infecções serem assintomáticas. Um aspecto discutível, em relação a este tipo de caracterização da endemidade, reside no facto de que esta classificação não incluiu as taxas de inoculação entomológica, nem os graus de transmissão da doença (alta e baixa) (Mouchet *et al.*, 2004).

Figura II.1. Distribuição de níveis de endemidade por *P. falciparum*, nas áreas de risco



Fonte: Retirado e adaptado de Snow *et al.* (2005).

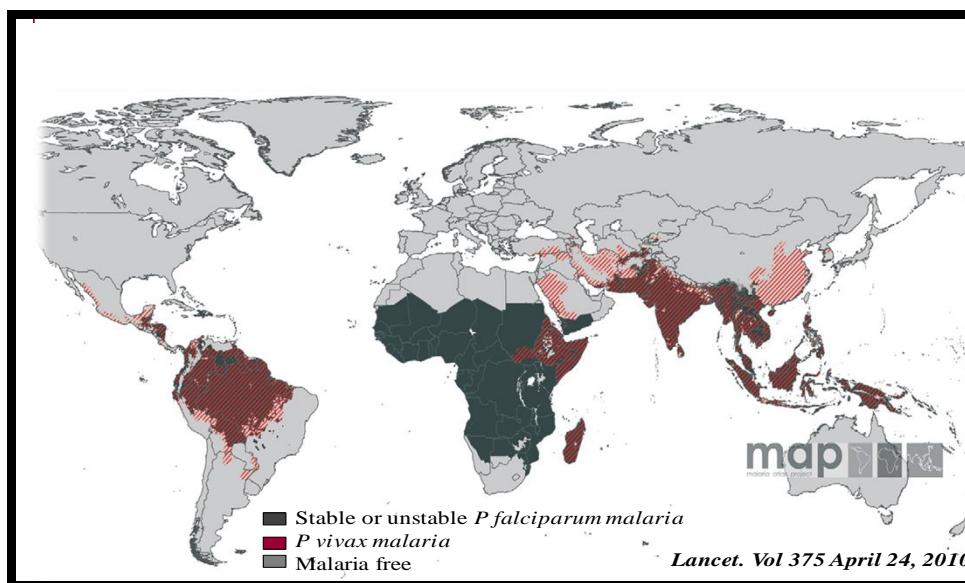
Legenda: Níveis de Endemidade ( Snow *et al.*, 2005).

-  Regiões hipoendémicas
-  Regiões mesoendémicas
-  Regiões hiperendémicas e holoendémicas
-  Regiões combinadas entre áreas fora dos limites de transmissão e áreas com densidade populacional menor de 1 pessoa/km<sup>2</sup>

## II.4. Distribuição Geográfica da Malária

A malária ocorre na maioria das regiões tropicais e subtropicais do mundo (Figura II.2), estando as espécies de *Plasmodium* distribuídas de modo diferente entre as regiões onde a doença é endêmica. A transmissão ocorre em 109 países (WHO, 2009, 2010c, 2011; Vitoria *et al.*, 2009) onde a malária é endêmica. Enquanto *P. falciparum* predomina em África, Nova Guiné e Haiti, *P. vivax* é mais comum na América Central. A prevalência destas duas espécies é aproximadamente igual na América do Sul, no Subcontinente Indiano, na Ásia oriental e Oceânia. Apesar de *P. malariae* coexistir na maioria das áreas endêmicas, especialmente ao longo da África subsariana, a sua prevalência é muito menos comum. Relativamente a *P. ovale* é pouco comum fora da África, estimando-se prevalências globais menores que 1% (WHO, 2008a, 2009, 2010c, 2011; Crawley *et al.*, 2010; Guerra *et al.*, 2010).

Figura II.2. Distribuição global da malária por *P. falciparum* e *P. vivax*, em 2007



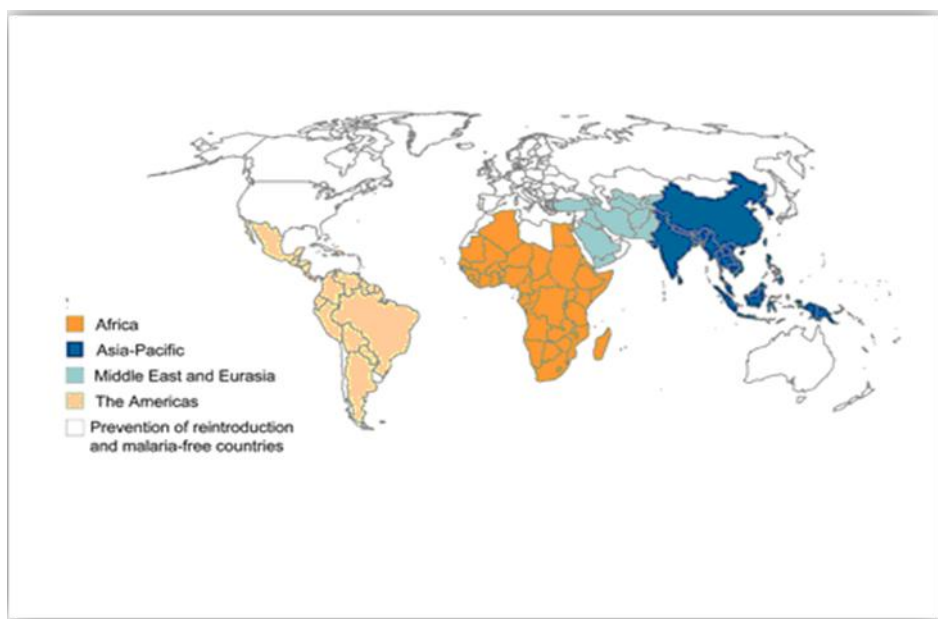
Fonte: Retirado e adaptado de Crawley *et al.* (2010).

A Figura II.3. mostra como se agruparam os países endêmicos, em quatro regiões: **África, América, Ásia-Pacífico, Médio Oriente e Eurásia**. Esta categorização permite uma clarificação dos níveis de endemicidade (WHO, 2009). Naturalmente que os países dentro da mesma região diferem substancialmente em dimensões, em



estratégias de controlo, nas densidades das populações de risco, no fardo da doença em termos de mortes e número de casos (taxas de morbimortalidade), na co-ocorrência de múltiplas espécies e no nível de fundos disponíveis para combater a doença. África é distinta, estima-se que quase 100% dos casos registados são causados por *P.falciparum* e um elevado número de mortes ocorrerem na população de risco (Worrall *et al.*, 2004; WHO, 2009). Contudo a implantação dos planos estratégicos regionais de controlo e eliminação da doença dependem mais do apoio externo (doadores) do que dos orçamentos governamentais em quase todos os países da região africana. Cerca de trinta e cinco países (30 em África e cinco na Ásia-Pacífico), são responsáveis por 98% das mortes totais por malária e contribuem em 96% para o número total de casos sintomáticos (WHO, 2009; 2010c, 2011).

Figura II.3. Países endémicos de malária distribuídos em quatro regiões



Fonte: Retirado de WHO (2009).

De acordo com os dados da OMS (WHO, 2009, 2010c, 2011) cerca de metade da população mundial está em risco de contrair a malária, apesar de ter sido erradicada dos Estados Unidos, Canadá, Europa e Rússia, mantendo-se no entanto endémica nas regiões tropicais e subtropicais. Tal como nos referimos nos parágrafos

anteriores, aproximadamente noventa por cento, dos 300 a 500 milhões de casos de malária estimados a nível mundial, ocorrem em cada ano na África Subsaariana.

Dados reportados por Tanser (2003), revelaram que as declarações sobre as mudanças de clima e o impacto sobre a saúde humana têm sido frequentemente focalizadas nesta região e que os estudos preditivos estimam que na segunda metade do século XXI, ocorrerão mais de dez milhões de novos casos como resultado directo do aumento crescente da temperatura (Tanser *et al.*, 2003). O aquecimento global do planeta constitui actualmente uma inquietação para todos os habitantes e governantes. Existem muitas especulações quanto ao impacto potencial da mudança de clima sobre a saúde humana e com particular ênfase na malária. O aumento dos acessos palustres em função desse aquecimento tem sido mediatizado pela maior parte dos climatólogos e paludólogos, apesar da inexistência de evidências (Tanser *et al.*, 2003; Reiter, 2008). As previsões são comuns para as próximas décadas, prevendo-se que até mesmo centenas de milhões de novos casos aconteçam em regiões onde a transmissão da doença já existe e que se estendam para outras altitudes e latitudes. Apoiadas em modelos simples, as previsões são convincentes porque, apesar de intuitivas, invocam factores que são fundamentais à transmissão e epidemiologia da doença: A ecologia e comportamento de humanos e vectores e a imunidade da população humana (Tanser *et al.*, 2003; Reiter, 2008). Para Paul Reiter (2008), só uma visão holística da história natural da doença constituirá o único incentivo válido para se estimar o significado provável das mudanças futuras do clima, no contexto dos factores determinantes da transmissão da doença.

## II.5. Diagnóstico de Infecção Malárica

Até muito recentemente os epidemiologistas tinham poucas ferramentas para, além do microscópio, os ajudar no estudo e na compreensão da complexa epidemiologia da infecção malárica. Na última década, novas técnicas têm sido aplicadas com sucesso espectacular. Dados coleccionados por satélite permitiram delinear a distribuição da malária com mais precisão do que no passado, elaborar mapas de prevalência com emparelhamento de algumas variáveis, como o clima, densidade populacional, solos, utilizando sistemas de informação geográfica [*geographical information systems (GIS)*]

(Snow *et al.*, 1999a; Greenwood, 2002). No laboratório, o desenvolvimento da PCR (reação em cadeia da polimerase) (Brown *et al.*, 1992; Snounou *et al.*, 1993; Zaman *et al.*, 2001; Hänscheid, 2003), uma técnica de genética molecular, tem melhorado a compreensão da epidemiologia da infecção abordando os três elementos do ciclo interactivo (parasita, vector e o hospedeiro). Esta técnica, que envolve a amplificação repetida de pequenos fragmentos do DNA presentes na amostra a ser testada, tem uma grande vantagem para os epidemiologistas da malária: o DNA é relativamente robusto, estando o transporte das amostras do campo para o laboratório central e subsequente armazenamento pouco propenso a problemas, quando comparado com a transferência de soros (Greenwood, 2002).

Os diferentes meios utilizados para o diagnóstico de malária são directos e indirectos (Moody, 2002; Mouchet *et al.*, 2004). As técnicas directas são os exames parasitológicos, que permitem evidenciar o(s) parasita(s) ou as hemácias parasitadas. Os métodos indirectos estão ligados à imunologia (detecção de antígenos plasmodial ou de anticorpos) ou à biologia molecular (sondas genômicas) (Moody, 2002; Hänscheid, 2003; Mouchet *et al.*, 2004). Entre os exames parasitológicos directos destacamos a gota espessa e o esfregaço – estes dois métodos são complementares (WHO, 1999a; Mouchet *et al.*, 2004), apesar de a sua aprendizagem continuar a ser complicada, particularmente na África subsariana (Moody, 2002; Hänscheid, 2003; Mouchet *et al.*, 2004). O esfregaço permite a identificação isolada de cada espécie (WHO, 1999a; Moody & Chiodini, 2000; Hänscheid, 2003). A gota espessa é o melhor método para a detecção da parasitémia; apesar de ser de leitura mais rápida, o diagnóstico da espécie é muito mais complicado (Moody & Chiodini, 2000; Hänscheid, 2003; Mouchet *et al.*, 2004). A microscopia convencional permite a identificação da(s) espécie(s) de *Plasmodium* presentes na infecção e uma estimativa da densidade parasitária. Um microscopista experiente pode também fazer alguma estimativa da viabilidade do parasita, apesar da quantidade de informação epidemiológica fornecida ser muito limitada (Greenwood, 2002; Ohrt *et al.*, 2002; Hänscheid, 2003). Segundo a OMS (WHO, 1990) a contagem de parasitas por microlitro de sangue ( $\mu\text{l}$ ), numa lâmina (gota espessa e esfregaço) faz-se em relação a um número padrão de leucócitos (8.000), utilizando o seguinte procedimento:

- (1) Se, após a contagem de 200 leucócitos, forem identificados 10 ou mais parasitas, deve-se registrar na fórmula o número de parasitas/200 leucócitos;
- (2) Se, após a contagem de 200 leucócitos, forem identificados nove ou menos parasitas, deve-se continuar a contagem até atingir os 500 leucócitos e registrar na fórmula o número de parasitas contados por 500 leucócitos. Em cada caso o número de parasitas contados em relação aos leucócitos pode ser convertidos em parasitas por  $\mu\text{l}$  através da seguinte fórmula matemática:

$$N^{\circ} \text{ de parasitas por } \mu\text{l} = \frac{N^{\circ} \text{ de parasitas} \times 8000}{N^{\circ} \text{ de leucóctitos}}$$

Estudos sobre a epidemiologia da malária têm tradicionalmente usado a microscopia óptica (MO), para avaliar quer a prevalência da infecção na população humana, quer a densidade parasitária. Este método permite a diferenciação entre as espécies, mas não diferencia os subtipos de uma mesma espécie. Na prática a microscopia convencional, por se tratar de uma técnica menos sensível (Moody, 2002; Ohrt *et al.*, 2002; Hänscheid, 2003) e depender sobretudo da experiência do técnico, permite em regra a detecção de 1 a 2% das infecções com mais de uma espécie (Zaman *et al.*, 2001; Mayxay *et al.*, 2004).

O advento da biologia e da genética molecular trouxeram consigo algumas descobertas com implicações no diagnóstico, terapêutica e “follow up” de doentes do foro das mais diversas especialidades médicas. A técnica de PCR (Snounou *et al.*, 1993; Moody & Chiodini, 2000; Zaman *et al.*, 2001, ) permite, quando utilizada em grandes amostras, a identificação das variações do parasita da malária e a detecção de populações parasitárias mistas, sobretudo quando existentes em níveis muito baixos (Snounou *et al.*, 1993; Zaman *et al.*, 2001; Moody, 2002; Greenwood, 2002; Hänscheid, 2003). Na Tabela II.3 apresentamos algumas das aplicações da técnica de PCR nos estudos epidemiológicos da malária.

Tabela II.3. Aplicação da técnica de PCR no estudo epidemiológico da malária

• Detecção da infecção subpatente
• Detecção das infecções mistas
• Estudo da multiplicidade da infecção e suas consequências
• Pesquisa de mutações, polimorfismos binários e análise de microssatélites
• Diferenciação de recrudescências e reinfecção após o tratamento
• Identificação dos marcadores de resistência a fármacos

Fonte: Retirado e adaptado de Greenwood (2002).

As técnicas de PCR são bastante sensíveis, permitem o reconhecimento de parasitemias muito baixas e são capazes de detectar menos de um parasita/microlitro ( $<1$  parasita/  $\mu$ l) (Snounou *et al.*, 1993; Zaman *et al.*, 2001; Greenwood, 2002; Moody, 2002); isto contrasta com uma boa microscopia que detecta por volta de 10-50 parasitas por microlitro (Moody, 2002; Greenwood, 2002). Nas regiões holo-endémicas onde quase todos os indivíduos são portadores de parasitas, esta técnica é de elevada utilidade particularmente na identificação e confirmação das infecções causadas por mais de uma espécie parasitária (Snounou *et al.*, 1993; Zaman *et al.*, 2001; Greenwood, 2002; Hänscheid, 2003; Snounou *et al.*, 2004). Os custos e a complexidade das técnicas ligadas à imunologia ou à biologia molecular não permitem, actualmente, a sua utilização de rotina sobretudo em África, mantendo-se a expectativa do baixo custo e aperfeiçoamento dos testes rápidos de diagnóstico (*Rapid Diagnostic Test* - RDT) (WHO, 1999a; Moody, 2002; Mouchet *et al.*, 2004). Os métodos baseados na PCR, ainda que de uso relativamente recente, constituem um poderoso meio complementar de diagnóstico. Estes métodos têm, ainda, a vantagem de detectarem directamente o genoma da espécie parasitária, independentemente do estado imunológico ou replicativo, aumentando por isso a sua eficiência de detecção. No entanto, a urgência e a necessidade da obtenção de resultados rápidos a partir de amostras de sangue em pacientes com suspeita de malária aguda torna estes métodos impraticáveis para o uso em laboratórios de rotina, principalmente em países endémicos (Moody & Chiodini, 2000; Moody, 2002), onde a MO continua a ser o procedimento de referência para o diagnóstico. De acordo com a OMS (WHO, 1999a) os RDT devem: ser tão precisos quanto os resultados obtidos a partir da microscopia realizada por um técnico em

condições de rotina de campo; ter uma sensibilidade acima de 95% (em relação a microscopia). Os RDT estão baseados na detecção de antígenos derivados do parasita, utilizando o método imunocromatográfico. São de fácil execução e rápidos (aproximadamente 15 minutos) (WHO, 1999a, 2010b, 2006b; Moody, 2002; Lee *et al.*, 2002; Portero *et al.*, 2010); considerados testes úteis em triagem e confirmação diagnóstica, principalmente em situações de não aplicabilidade da microscopia (i.e. áreas de difícil acesso).

Actualmente, estão disponíveis vários “kits” de testes comerciais, prevendo-se uma evolução rápida e melhoria técnica dos RDTs. Mencionamos alguns testes comercialmente disponíveis: 1) testes baseados na detecção da proteína II rica em histidina (*Histidine-rich protein II* - HRP-2); 2) testes baseados na detecção da lactato desidrogenase de *Plasmodium sp.* (*parasite lactate dehydrogenase* - pLDH) e 3) teste mais recente que combina a detecção dos antígenos circulantes de *P. falciparum* (HRPII *antigen*) e o antígeno comum a todas as quatro espécies a aldolase (*aldolase antigen*) conhecido com a seguinte designação comercial (ICT Malaria Combo Cassette Test) (WHO, 1999a, 2010b; Moody, 2002; Lee *et al.*, 2002; Portero *et al.*, 2010).

## II.5.1. Indicadores Parasitários

### II.5.1.1. Prevalência

Segundo Mouchet (2004), a prevalência corresponde à proporção de sujeitos portadores de *Plasmodium* em determinado local, data e grupo etário, o que equivale a uma “fotografia da situação”. Pode-se também considerar a prevalência em função de uma determinada época sazonal, por exemplo, durante a estação das chuvas (estação de transmissão) ou durante o período seco ou num determinado grupo etário. Este é um indicador transversal muitas vezes utilizado para quantificar e classificar a endemia malárica. Durante longos anos a prevalência era determinada indirectamente a partir da identificação dos sujeitos portadores de esplenomegalia (considerada como sendo um sinal de infecção malárica) utilizando uma escala de avaliação da hipertrofia esplénica (escala de Hackett, 1944) (*in* Mouchet *et al.*, 2004) de cinco graus (1-5) referentes à

dimensão do baço a partir do rebordo costal. Actualmente, a avaliação da prevalência utiliza os índices parasitários ou o índice plasmódico (IP) (Mouchet *et al.*, 2004).

#### II.5.1.2. Definição epidemiológica de malária clínica

Apesar de o ciclo de vida do parasita da malária ter sido descrito há um século, novos aspectos da epidemiologia da doença foram recentemente descritos. Os epidemiologistas têm dado uma maior atenção à epidemiologia da *malária clínica* em oposição à epidemiologia da *infecção malárica* (Greenwood, 1997; Greenwood, 2002). Esta mudança de ênfase foi em parte estimulada pela necessidade de uma melhor *definição clínica da malária* na avaliação das medidas de controlo, tais como a utilização de mosquiteiros tratados com insecticida e vacinas contra a malária (Greenwood, 1997; Greenwood, 2002). Um estudo em pacientes com malária não complicada lançou clareza sobre a relação entre a febre e a densidade parasitária e ajudou a definir o “limiar da febre”. Recentemente, foram desenvolvidos algoritmos para auxiliar no diagnóstico da malária na ausência de confirmação parasitológica, mas esta abordagem tem sido difícil devido à sobreposição de sintomas e sinais entre a malária e outras doenças febris agudas endémicas, na maior parte dos países Africanos, como por exemplo: pneumonias, arboviroses, diarreias infecciosas agudas, doenças exantemáticas em fase pré-exantema e viroses (Greenwood, 1997; Greenwood, 2002). As implicações epidemiológicas dos níveis persistentes de parasitémia encontrados em indivíduos saudáveis em muitas áreas endémicas de malária não foram completamente exploradas (Culleton *et al.*, 2008; Greenwood, 1997). Pensa-se que pode beneficiar o hospedeiro humano na mediação da resposta imuno-protectora, quer a diferenciação precoce dos merozoítos em gametócitos como também uma possível manutenção persistente de uma densidade parasitária abaixo do limiar da doença (dependente do sistema imuno-regulador). Ao serem confirmados estes mecanismos de resposta do sistema imune na imunidade protectora (premunição) o tratamento das infecções assintomáticas seria pouco inteligente (Culleton *et al.*, 2008). Segundo Greenwood (1997), para os epidemiologistas, a melhor definição de “ataque clínico de malária” em

áreas altamente endêmicas deve ser: (1) presença de febre ou história recente de febre; 2) presença de parasitemia malárica acima do limiar definido para a população em estudo; (3) ausência de qualquer outra causa de febre, nomeadamente outras causas infecciosas.

Métodos de determinação da mortalidade por malária e da definição de malária grave e sem complicações têm sido propostos (Greenwood, 1997). Os poucos dados disponíveis indicam que a mortalidade atribuível à malária e a incidência<sup>1</sup> da malária grave não aumentam proporcionalmente com a subida (acima de um determinado limite) da taxa de inoculação entomológica (Greenwood, 1997). Esta observação tem implicações relevantes nos esforços para conter a malária através do controlo do(s) vector(es) (Greenwood, 1997). Estudos sobre a epidemiologia da malária grave em África mostraram diferentes padrões epidemiológicos para as duas formas mais frequentes desta condição: a *malária cerebral* e a *anemia severa da malária*. Enquanto a anemia severa da malária é vista com mais frequência em zonas de muito elevada transmissão e mais em crianças pequenas, a malária cerebral predomina em zonas de moderada transmissão, especialmente quando esta é sazonal, ocorrendo mais frequentemente em crianças mais velhas (Greenwood, 1997; Snow *et al.*, 1997; Greenwood, 2002; Crawley *et al.*, 2010).

---

<sup>1</sup> Incidência- é o número de novos casos, geralmente reportados a 1.000 habitantes, num determinado grupo populacional ou faixa etária, num dado lapso de tempo, mais frequentemente um ano (Mouchet *et al.*, 2004).



### III. ETIOLOGIA E IMUNOPATOGENESE

#### III.1. O Parasita (*Plasmodium*)

Segundo Dronamraju (2006) existem descritas aproximadamente 200 espécies do género *Plasmodium* que parasitam répteis, aves e mamíferos. *Plasmodium* pertence ao Filo Apicomplexa, que integra mais de 5.000 espécies já descritas e outras tantas por descrever, constituído por seres eucariontes unicelulares, que possuem um complexo apical intracelular visível ao microscópio electrónico e que joga um papel importante na penetração das células hospedeiras. Outros Apicomplexa, para além do *Plasmodium* e patogénicos humanos são: *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* e *Babesia* (Dronamraju *et al.*, 2006). A Família *Plasmodidae*, à qual pertence o género *Plasmodium*, caracteriza-se por apresentar dois tipos de multiplicação no seu ciclo de vida: uma *assexuada* e outra *sexuada* (White & Plorde, 1991; Mouchet *et al.*, 2004; Dronamraju *et al.*, 2006).

A malária é uma protozoose dos eritrócitos, causada nos seres humanos por cinco espécies do género *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*) (Cox-Singh *et al.*, 2008; van Hellemond *et al.*, 2009; Crawley *et al.*, 2010), transmitida pela picada do mosquito fêmea do género *Anopheles*. Em situações excepcionais, a doença pode ser transmitida por transfusão sanguínea e via congénita (mãe para o feto), contudo estas duas formas de transmissão não têm qualquer impacto epidemiológico. Desde os tempos historicamente antigos, sobretudo na Europa, que a doença era identificada como episódios febris caracterizados por paroxismos e recorrências de febre terçã benigna (*P. vivax*) e febre quartã (*P. malariae*), assim designados porque se considerava não estarem associados a formas severas e fatais da doença. A febre “terçã maligna” ou “subterçã maligna” era atribuída a *P. falciparum* e geralmente associada a formas severas e fatais da doença (Schofield & Grau, 2005; Milner *et al.*, 2009; WHO, 1990; Verra *et al.*, 2009). O quarto parasita humano da malária é *P. ovale*, tal como *P. vivax*, é o responsável pela febre terçã benigna (associado a paroxismos febris e recorrências). Tem a distribuição mais limitada de todos os parasitas de malária em humanos. É prevalente na maioria dos países da África subsariana, sendo endémico na Nova Guiné e nas Filipinas (Carter & Mendis, 2002;

WHO, 2009) (Tabela III.1). Segundo Collins & Jeffery (2005), *P. ovale* raramente é encontrado em outros continentes, sendo frequentemente identificado na África subsariana e em algumas ilhas do oeste Pacífico. Para Mayxay (2004) *P. ovale* é raro fora da África ocidental. Actualmente sugere-se que, devido ao movimento das populações humanas, existe a possibilidade da presença da espécie em outras regiões tropicais onde estiverem presentes os vectores susceptíveis (Collins & Jeffery, 2005).

Recentemente foi descrita uma quinta espécie de *Plasmodium* que durante muito tempo se pensava que parasitava apenas os primatas (Garnham, 1966; White, 2003; Cox-Singh *et al.*, 2008): *P. knowlesi* é um parasita da malária nos macacos do velho mundo. Ocorre em macacos e porcos de cauda-longa, que habitam as florestas do sudoeste Asiático (Garnham, 1966; White, 2003; van Hellemond *et al.*, 2009) e pode ser transmitida a humanos através da picada de um mosquito infectado. Até muito recentemente pensava-se que a infecção nos humanos era rara (Cox-Singh *et al.*, 2008; van Hellemond *et al.*, 2009) mas, desde 2004, têm sido relatados casos de infecção entre os humanos (Cox-Singh *et al.*, 2008; van Hellemond *et al.*, 2009) num grande número de pacientes na Tailândia, Filipinas, Singapura e Malásia (Cox-Singh *et al.*, 2008; van Hellemond *et al.*, 2009). Até a utilização da técnica nested-PCR nas regiões endémicas do sudoeste asiático, muitos casos de infecção por *P. knowlesi* eram erradamente diagnosticados como *P. malariae* (Cox-Singh *et al.*, 2008; van Hellemond *et al.*, 2009), pelo facto dos parasitas das espécies *P. malariae* e *P. knowlesi* serem difíceis de distinguir ao microscópio. Contrariamente ao que se pensava no passado, as infecções por *P. knowlesi* são uma importante causa de malária grave e fatal em humanos (Cox-Singh *et al.*, 2008, van Hellemond *et al.*, 2009).

Tabela III.1. Distribuição representativa de quatro espécies de *Plasmodium sp.* no mundo

Espécies	Distribuição das espécies em % (total de casos)						
	África Subsariana		Asia (toda)	Pacífico e Sudoeste Asiático	Pacífico do Oeste	América Central e Caraíbas	América do Sul
	África Central e Ocidental	África Oriental e do Sul					
<i>P. falciparum</i>	88.2	78.8	4.2	51.4	43.0	12.9	29.2
<i>P. vivax</i>	1.2	9.8	95.6	48.6	56.1	87.1	70.6
<i>P. malariae</i>	2.2	3.0	0.0	-----	0.9	0.0	0.2
<i>P. ovale</i>	8.4	8.4	0.2	-----	0.0	0.0	0.0

Fonte: Retirado e adaptado de Carter & Mendis (2002)

### III.2. Ciclo de Vida do *Plasmodium* Humano

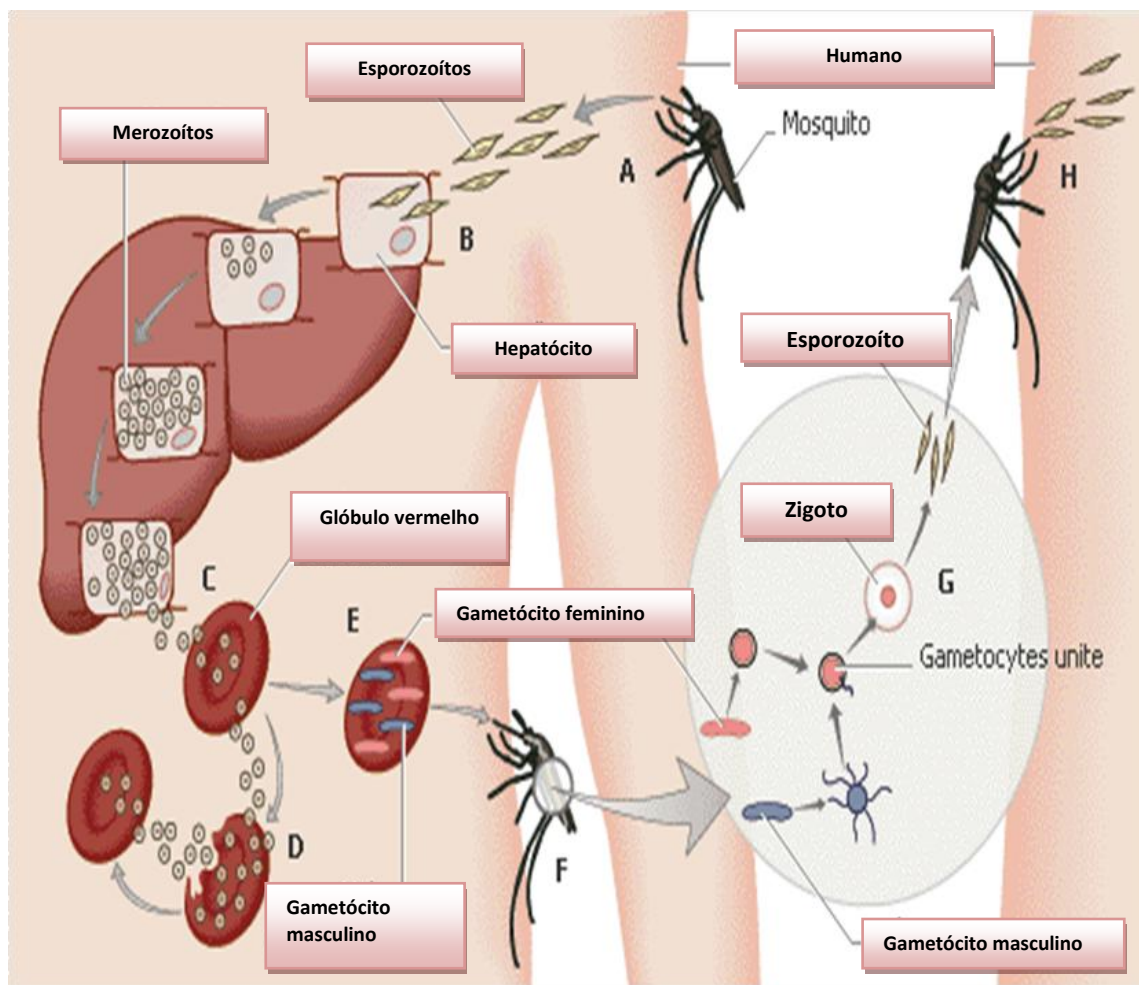
A compreensão da patogenia da malária exige a investigação dos mecanismos de invasão do parasita e de defesa do hospedeiro. O ciclo de vida do parasita ilustra a interacção entre parasita e o hospedeiro ( White, 2003; Mouchet *et al.*, 2004; Milner *et al.*, 2009; Moxon *et al.*, 2011) (Figura III.1). Classicamente, o ciclo de vida do *Plasmodium* pode ser dividido em três estádios: fase sexuada que ocorre no hospedeiro invertebrado - mosquito - (*ciclo esporogónico*) e duas fases assexuadas que acontecem no hospedeiro humano: o ciclo *exoeritrocítico* que sucede no fígado e o ciclo *eritrocítico* que se desenvolve no interior dos glóbulos vermelhos. A transmissão natural da malária humana ocorre quando a fêmea do mosquito *Anopheles* durante a sua refeição sanguínea inocula no hospedeiro por picada as formas infectantes do parasita, denominadas esporozoítos (White & Plorde, 1991; White, 2003; Milner *et al.*, 2009) (Figura III.1). Os estudos reportam que o número de esporozoítos inoculados no homem numa picada do mosquito infectado podem variar entre cerca de oito e cem (White, 2003; Schofield, 2005). Esta fase é transitória e não causa sintomas (Schofield, 2005). No entanto, sabe-se que em modelos animais, apesar de os esporozoítos poderem ser injectados directamente nos capilares sanguíneos do hospedeiro, a maior parte deles são inoculados no tecido subcutâneo (Pradel & Frevert, 2001; Vanderberg & Frevert, 2004; Baer *et al.*, 2007). Um estudo realizado com *P. berghei* em roedores demonstrou que apenas uma proporção dos esporozoítos inoculados na derme invade os capilares sanguíneos, sendo os restantes drenados pelos vasos linfáticos (Amino *et al.*, 2006). Somente aqueles que penetram nos capilares chegam aos hepatócitos iniciando desse modo o ciclo exoeritrocítico (Vanderberg & Frevert, 2004; Amino *et al.*, 2006).

Em humanos após a invasão do hepatócito, os esporozoítos, por replicação intracelular crescem e multiplicam-se por reprodução assexuada (*esquizogonia*) (Schofield & Grau, 2005), durante um período que varia entre seis a quinze dias (White, 2003), originando milhares de merozoítos (30.000 a 40.000), dependendo da espécie. Até muito recentemente, a libertação dos merozoítos hepáticos para a circulação sanguínea era referida como consequência da ruptura dos hepatócitos infectados, mas esse fenómeno nunca havia sido evidenciado. Contrariando esta teoria demonstrou-se, recentemente, em modelos experimentais, que os merozoítos são libertados para os

sinusóides hepáticos envolvidos por uma estrutura vesicular denominada *merosoma* cuja superfície possui moléculas que interagem com o endotélio dos sinusóides hepáticos (Pradel & Frevert, 2001; Sturm *et al.*, 2006). Têm a capacidade de não serem reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro, permanecendo intactos por pelo menos uma hora. Sem o reconhecimento pelas células fagocitárias os merozoítos, após romperem a membrana do merosoma, são libertados na circulação para invasão dos eritrócitos iniciando o ciclo sanguíneo (*ciclo eritrocítico*), que coincide com o início da sintomatologia (Sturm *et al.*, 2006).

O período de crescimento e maturação (incubação) nas células do fígado varia de acordo com as espécies de *Plasmodium*: enquanto *P. falciparum* e *P. vivax* requerem aproximadamente uma semana [(média de 13,1 e 13,4 dias, respectivamente, segundo (White, 2003)] para *P. malariae* estão descritas cerca de duas semanas [(34,7 dias segundo White (2003)] e 24 horas para *P. knowlesi* (Cox-Singh *et al.*, 2008; van Hellemond *et al.*, 2009). Nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale*, o mosquito inocula distintas populações de esporozoítos; algumas desenvolvem-se muito rapidamente enquanto outras ficam em estado de latência no fígado (hipnozoítos) (White & Plorde, 1991; White, 2003). Estas formas permanecerão “*adormecidas*” durante semanas, meses ou mesmo anos, até à sua reactivação, altura em que completarão o ciclo hepático, dando origem às recaídas característica de ambas as espécies (White, 2003). O *ciclo eritrocítico* do parasita desenvolve-se em duas fases distintas: (i) multiplicação assexuada por esquizogonia e (ii) diferenciação em estágios sexuais, denominados gametócitos, que irão desenvolver-se no mosquito dando origem aos esporozoítos. Durante a esquizogonia sanguínea são libertados os merozoítos que invadem os eritrócitos, transformando-se em trofozoítos, os quais, depois de completar o estágio de crescimento vegetativo, desenvolvem-se em esquizontes. Durante a fase de desenvolvimento intraeritrocitário as “formas em anel” ou trofozoítos aumentam e assumem características específicas de espécie e adquirindo a forma irregular (amebóide) tornam-se evidentes ao exame microscópico. Após 48 horas, os glóbulos vermelhos parasitados rompem e libertam novos merozoítos que vão invadir, sucessivamente, novos glóbulos vermelhos, perpetuando e promovendo o ciclo eritrocitário (White & Plorde, 1991; White, 2003; Schofield & Grau, 2005).

Figura III.1. Ciclo de vida de *Plasmodium sp*



Fonte : Retirado e adaptado de Philippines.com.au (T073615A.gif).

A presença do parasita e invasão de glóbulos vermelhos pode não ser suficiente para produzir doença, ao contrário da libertação de moléculas bioativas do parasita e da resposta imunológica inadequada do hospedeiro, que pode ser a principal causa da patogénese sobretudo fatal em uma minoria dos pacientes (Schofield & Grau, 2005).

A invasão dos eritrócitos é um processo crucial à sobrevivência do parasita (White, 2003; Verra *et al.*, 2009; Moxon *et al.*, 2011) e envolve uma sequência complexa de eventos: *ligação à superfície dos eritrócitos, reorientação, formação de uma adesão fixa e finalmente a internalização* (Williams, 2006). Este processo de invasão dos glóbulos vermelhos pelos merozoítos é mediado por vários receptores específicos de superfície dos eritrócitos de origem parasitária como por exemplo em *P. falciparum*, a proteína 1 da membrana do eritrócito [*P. falciparum* erythrocyte-

*membrane protein-1* (PfEMP1)] e antígenos de superfície de eritrócitos infectados (*ring infected erythrocyte surface antigens*-RESA)], assim como as proteínas humanas incluindo a espectina, actina e banda 4.1 (Flick & Chen, 2004; Milner *et al.*, 2009).

Outro exemplo clássico, mas controverso actualmente, é o factor Duffy do grupo sanguíneo - um antígeno dos glóbulos vermelhos necessários à invasão de *P. vivax* (White & Plorde, 1991; White, 2003; Milner *et al.*, 2009; Verra *et al.*, 2009). Admitia-se no passado que o antígeno Duffy, uma quimoquina receptora expressa em várias linhagens de células que revoga apenas, na linhagem eritróide, a ponte de ligação para o factor de transcrição GATA-1, proporcionaria uma vantagem selectiva, prevenindo a invasão do eritrócito por *P. vivax*. A ausência da proteína Duffy nos eritrócitos, que correspondem ao fenótipo FY:-1, -2 ou Duffy negativo é predominante nos africanos que possuem o alelo FY2 (ES) (White & Plorde, 1991; Rosenberg, 2007; Hedrick, 2011). Este alelo apresenta uma mutação na região promotora do gene, abolindo a expressão da proteína apenas nas hemácias. O FY2 é fracamente expresso nos eritrócitos FY:-1, -2 WK. Estudos evidenciaram que a maioria dos africanos ocidentais são Duffy-negativos, logo, segundo esta antiga hipótese seriam mais resistentes à infecção por *P. vivax*, sugerindo-se que FY teria sido alvo de selecção natural pelo parasita (Miller *et al.*, 1976; Cavasini, 2001). A ausência do antígeno Duffy nos eritrócitos foi considerada como uma protecção natural à malária por *P. vivax*, durante muito tempo (White, 2003; Milner *et al.*, 2009; Verra *et al.*, 2009). Dados diferentes obtidos em estudos recentes demonstraram infecção por *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos nos isolados de Angola e Guiné Equatorial (Mendes *et al.*, 2011), Brasil, Quénia (Milner *et al.*, 2009) e Madagáscar (Ménard *et al.*, 2010), sugerindo que *P. vivax* é capaz de usar outros receptores como alternativa à invasão dos glóbulos vermelhos Duffy-negativos (Rosenberg, 2007; Milner *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2011). Segundo White (2003), ainda não são conhecidos os receptores de superfície dos glóbulos vermelhos para *P. malariae* e *P. ovale*.

Estima-se que por cada esquizonte maduro são libertados entre seis a 24 merozoítos. A lise dos glóbulos vermelhos (Figura III.2) e a consequente libertação de moléculas bioactivas do parasita na circulação e as reacções do hospedeiro a estes eventos, estão associados à patogénese e às manifestações clínicas da doença (Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003).

Figura III.2. Hemólise do Eritrócito Parasitado



Fonte: [http://www. Gateway images.](http://www.Gatewayimages.com)

O ciclo sanguíneo repete-se sucessivas vezes, dependendo da espécie de *Plasmodium* a doença pode manifestar-se na forma não grave, evoluindo ou não para a forma grave e fatal. Nas infecções por *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. knowlesi*, predominam as formas não graves da doença, caracterizadas por febre intermitente, intensa debilidade física, entre outros sintomas, podendo evoluir para a cronicidade e doença aguda fatal (esta particularmente nos casos de infecção por *P. vivax* e *P. knowlesi*), se não reconhecida e tratada correcta e precocemente. Nas infecções por *P. falciparum*, como referido, ocorrem as manifestações mais graves da doença, sobretudo em crianças menores de cinco anos de idade e mulheres grávidas, sendo responsável pelo maior número de mortes por malária, nas regiões do globo onde a espécie é predominante. Como manifestações graves da doença, destacam-se os quadros de malária cerebral, anemia severa da malária, disfunção multiorgânica (hepático-renal), acidose metabólica e síndrome de stress respiratório do adulto (SDRA) (Chen *et al.*, 2000; Owusu-Agyei *et al.*, 2009; Milner *et al.*, 2009).

Apesar de não estar suficientemente esclarecido, sabe-se que nem todos os merozoítos que invadem os eritrócitos se transformam em trofozoítos, diferenciando-se alguns em formas sexuadas: gametócitos masculino (microgametócito) e feminino (macrogametócito). Este processo coincide com a fase infectante do hospedeiro

humano. Após a picada, o mosquito, ao efectuar a sua refeição sanguínea, ingere os gametócitos. Inicia-se um processo dentro do lúmen do intestino médio de exflagelação que resulta na libertação de quatro a oito microgâmetas nucleados. Ocorre fecundação do macrogâmeta pelo microgâmeta com a consequente formação da única forma diplóide do ciclo de vida - o zigoto (ciclo esporogónico ou sexual) (White, 2003) (Figura III.1). O zigoto resultante alonga-se e após divisão meiótica, por um período que varia entre 18-24 horas dá origem a uma forma móvel e haplóide denominada oocineto que penetra nas células epiteliais do intestino médio e se instala na superfície exterior junto à membrana basal, onde se enquista transformando-se em forma globular dando origem ao oocisto esférico. Os oocistos resultantes multiplicam-se por um processo de divisão assexuada, levando à libertação de esporozoítos que migram através do sistema hemolinfático até alcançarem as glândulas salivares do mosquito. Este processo de ruptura do oocisto, migração dos esporozoítos através do hemocélio, para as glândulas salivares do mosquito, dura aproximadamente sete a oito dias (White & Plord, 1991; White, 2003; Mouchet *et al.*, 2004). O mosquito fêmea ao efectuar uma nova refeição injecta os esporozoítos na corrente sanguínea do novo hospedeiro. O tempo necessário para a maturação dos esporozoítos varia em função da temperatura e da humidade, sendo em média de sete a 18 dias. Segundo White (2003), as condições óptimas para a transmissão da malária são a humidade e a temperatura ambiente entre os 20° e 30°C; temperaturas abaixo de 16° C e acima de 33° C e altitudes para além dos 2.000 m acima do nível do mar não favorecem o desenvolvimento do ciclo esporogónico e consequentemente não ocorre a transmissão da malária.

### III.3. Patogénese e Imunidade da Malária

A patogénese da malária está relacionada com múltiplos factores quer do hospedeiro como do parasita (Miller *at al.*, 1994) e a sua compreensão proporcionará o desenvolvimento de estratégias para a prevenção das formas mais graves da doença. Muitas teorias têm sido propostas para explicar a patogénese da malária cerebral no homem, contudo estes mecanismos permanecem ainda pouco claros (Kotlowski, 1993; Miller *et al.*, 1994; Kwiatkowski *et al.*, 1997). Lewis Thomas (1972) (*in* Mouchet *et al.*,



2004) sugeriu, em relação aos agentes infecciosos, que estes não agiam directamente e o processo inflamatório desencadeado pela resposta do hospedeiro à infecção era induzido por mediadores não solúveis, hoje conhecidos como citocinas pro-inflamatórias (Clark & Schofield, 2000; Clark *et al.*, 2004). A malária grave tem características comuns com a síndrome de sépsis grave. A fisiopatologia de ambos reflecte uma resposta do sistema inflamatório activador das citocinas (Ho & White, 1999; Hunt & Grau, 2003).

Os sintomas clínicos da malária estão associados à ruptura cíclica dos eritrócitos infectados e à libertação dos produtos de degradação dos eritrócitos, dos parasitas, incluindo o pigmento malárico (hemozoína), da glicosilfosfatidilinositol e da suposta "toxina da malária" (Schofield & Grau, 2005). A consequente activação das células mononucleares pode estimular a libertação das citocinas inflamatórias e tem sido proposto que o equilíbrio entre as citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias parece ser um determinante fundamental da gravidade da doença (Kwiatkowsk *et al.*, 1990; Ho & White, 1999; Schofield & Grau, 2005; Crawley *et al.*, 2010). Embora haja na malária por *P. falciparum* evidência de que o sequestro dos eritrócitos parasitados na microcirculação e a libertação excessiva de citocinas pro-inflamatórias constituem a principal força determinante que conduz à doença e morte, as opiniões dividem-se sobre qual o mecanismo mais relevante. A clarificação desta questão pode ter implicações importantes, quer na terapia específica quer na adjuvante (Schofield & Grau, 2005; Kwiatkowski, 2005; Crawley *et al.*, 2010).

### III.3.1. Citoquinas

Existe alguma contradição nos trabalhos publicados sobre o papel das citocinas na patogénese da malária-doença (Crawley *et al.*, 2010). Segundo Crawley (2010), muitos estudos incluíram pequeno número de pacientes e os resultados compilados reportam grupos que são clinicamente heterogéneos (malária grave, malária cerebral) (Crawley *et al.*, 2010). A co-morbidade, particularmente com a doença bacteriana invasiva, VIH/SIDA e malnutrição, tem sido cada vez mais relatada, especialmente em crianças com malária grave. Na verdade, o diagnóstico incorrecto poderia explicar muitas das diferenças aparentes entre a malária cerebral no adulto e criança, contudo a informação sobre os presumíveis factores de confusão continua a não existir (Crawley

*et al.*, 2010). Estudos recentes relatam o aumento da concentração das citocinas pro-inflamatórias: interleucina 1 $\beta$ , interleucina 6 e interleucina 8 em pacientes com malária e correlacionam-nas com a gravidade da doença (Crawley *et al.*, 2010). Factor de necrose tumoral  $\alpha$  [*Tumour necrosis factor  $\alpha$*  (TNF $\alpha$ )] parece ser fundamental tanto no início da resposta na malária por *P. falciparum* e *P. vivax* como no final, quando ocorrem manifestações graves da doença (Kwiatkowski *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 2004). As citocinas anti-inflamatórias interleucina 10 e o factor de crescimento transformante  $\beta$  [*transforming growth factor  $\beta$*  (TGF- $\beta$ )] parecem contrariar a resposta pro-inflamatória do prejuízo potencial dos antigénios maláricos (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003). Baixas concentrações de interleucina 10 e de TNF $\alpha$  têm sido encontrados em pacientes com anemia grave da malária. A diseritropoiese induzida pelas citocinas parece aumentar a remoção dos eritrócitos parasitados e não-parasitados do baço, contribuindo para a patogénese da anemia severa da malária (Weatherall *et al.*, 2002).

A rápida resolução do coma e subsequente recuperação da maioria dos pacientes com malária cerebral e a ausência de evidências em autópsias, em todos os casos fatais de sequestro na microcirculação, é aventado por alguns pesquisadores, como prova evidente de que o coma pode ser resultante de uma encefalopatia-metabólica, citocina-induzida e não secundária à obstrução do fluxo sanguíneo da microcirculação cerebral. Acidose metabólica é uma característica consistente de malária grave em crianças e adultos (English, 2000) e difere sobremaneira da acidose resultante da sépsis. A importância relativa da desidratação e hipovolemia *versus* obstrução microvascular na fisiopatologia da acidose é ainda muito controversa. Uma consequência prática desta polémica é a incerteza contínua sobre os riscos ou benefícios da utilização intravenosa de expansores de volume, especificamente as soluções de colóides (Crawley *et al.*, 2010).

### III.3.2. Citoaderência e Sequestro

Citoaderência é o factor major na patogénese da malária (Kwiatkowski, 2005, Moxon *et al.*, 2011). *In vivo*, é definida como a ligação mediada pelos receptores de eritrócitos infectados por *P. falciparum* ao endotélio pós-capilar (Ho & White, 1999).

Várias associações têm sido relatadas entre a malária grave e o polimorfismo dos receptores de eritrócitos infectados por *P. falciparum* para a citoaderência. Uma sequência de interações faz com que os eritrócitos parasitados se liguem aos receptores do endotélio, plaquetas e outros eritrócitos não parasitados (Figura III.3). Pensa-se que este facto resulta de uma estratégia de imune-evasão que permite ao parasita permanecer dentro do compartimento vascular evitando a circulação através do baço, de onde os eritrócitos parasitados seriam removidos (Kwiatkowski, 2005).

Do lado do parasita, a ligação principal é a PfEMP, que é exportada para a superfície do eritrócito. Esta proteína é codificada por uma família de genes denominados "*var*", possuindo cada parasita várias cópias diferentes do gene, expressando diferentes proteínas por comutação expressa entre as cópias do gene, mecanismo denominado por variação antigénica (Kyes *et al.*, 2001; Flick & Chen, 2004; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003; Kwiatkowski, 2005). No lado do hospedeiro, uma série de diferentes moléculas expressas no endotélio, plaquetas, macrófagos e eritrócitos (Tabela III.2), servem de receptores de ligação para diferentes formas de PfEMP-1. Como descrito, o fenómeno biológico da citoaderência do parasita ao endotélio e outras células é activado pelo parasita e não pelo hospedeiro. O parasita altera o seu padrão de sequestro nos diferentes órgãos pela constante troca entre as diferentes formas de PfEMP-1 que se ligam a receptores diferentes do hospedeiro (e diferentes partes do mesmo receptor) de um modo promíscuo e oportunista (Mackintosh *et al.*, 2004). A ligação ao endotélio em muitos isolados de *P. falciparum* faz-se pela via do antígeno CD36 (Ho & White, 1999; Kwiatkowski, 2005; Moxon *et al.*, 2011). CD36 é um receptor de uma série de moléculas diferentes incluindo trombospondina, ácidos gordos de cadeia longa estando expresso nas plaquetas, células dendríticas e no endotélio. Vários polimorfismos CD36 foram descritos em regiões endémicas de malária (Aitman *et al.*, 2000; Omi *et al.*, 2003), mas os resultados dos estudos de associação com a doença parecem pouco claros. Um estudo caso-controlo realizado na Gâmbia e Quênia demonstrou que homozigóticos com polimorfismos de alelos CD36<sup>+</sup> 1264G, eram susceptíveis à malária cerebral (Aitman *et al.*, 2000), mas o estudo do mesmo alelo realizado no Quênia revelou que a heterozigotia estava associada à protecção contra a malária severa (Pain *et al.*, 2001). Um estudo mais recente realizado na Tailândia (Omi *et al.*, 2003) mostrou uma significativa associação entre

determinados polimorfismos do gene CD36 e a severidade da malária em humanos, provendo protecção à malária cerebral. Um evento crítico na patogénese da malária grave é o sequestro dos eritrócitos infectados por *P. falciparum* nos pequenos vasos sanguíneos (Taylor *et al.*, 2000; Kwiatkowski, 2005; Schofield & Grau, 2005).

Tabela III.2. Moléculas do hospedeiro que medeiam a citoaderência dos eritrócitos infectados por *P. falciparum*, associados a resistência ou susceptibilidade à malária

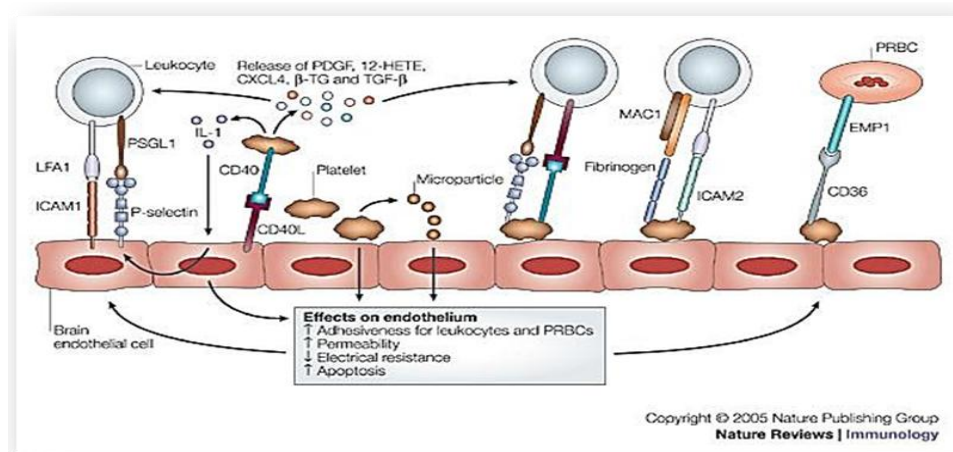
Gene	Proteína	Interacção com eritrócitos parasitados	Associação genética reportada com malária
<b>CD<sub>36</sub></b>	Antig. CD36, receptor trombospondina	EP-receptor que liga células dendríticas ao endotélio	Associação de polimorfismos CD36 com malária severa, na Gâmbia, Quênia e Tailândia.
<b>CR1</b>	CR1, receptor Complemento 1	EP-receptor que liga aos eritrócitos	Associação de polimorfismos CR1 com malária severa na Gâmbia, Tailândia e Nova Guiné.
<b>ICAM1</b>	CD54, molécula 1 de adesão intercelular	EP-receptor que liga ao endotélio	Associação de polimorfismos ICAM1 com malária severa no Quênia, Gabão e Gâmbia.
<b>PECAM1</b>	CD 31, molécula adesão células endoteliais-plaquetas	EP-receptor que liga ao endotélio	Associação de polimorfismos PECAM1 com malária severa na Tailândia, Quênia e Papua Nova Guiné.

EP – Eritrócitos parasitados,  
Fonte: Retirado e adaptado de Kwiatkowski (2005).

O sequestro de eritrócitos contendo formas maduras de *P. falciparum* na microcirculação dos mais importantes órgãos vitais é uma característica bem estabelecida da malária por *P. falciparum*, fatal em adultos, mas a confirmação deste evento em crianças foi relativamente recente (Schofield & Grau, 2005; Crawley *et al.*, 2010). O sequestro do eritrócito parasitado não decorre apenas da ligação endotelial, mas é resultante da interacção entre as moléculas derivadas do parasita expressas na superfície dos eritrócitos infectados (*knobs*) (Loscertales *et al.*, 2007) e dos receptores expressos na superfície do endotélio vascular, das quais a adesão intercelular ao receptor ICAM1 [*intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1)] é provavelmente o mais importante, especialmente a nível do cérebro (Ho & White, 1999; Mackintosh *et al.*, 2004; Crawley *et al.*, 2010; Moxon *et al.*, 2011) (Figura III.3). Pensa-se que a regulação activa do ICAM1 e de outros receptores endoteliais pelas citoquinas pro-inflamatórias

como o factor de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) promovem a citoaderência dos eritrócitos e de trombos plaquetários na microcirculação cerebral (Miller *et al.*, 1994). A angiopoetina 2 sensibiliza o endotélio vascular para a acção do TNF $\alpha$ . Concentrações elevadas da angiopoetina 2 podem também comprometer a integridade da barreira hemato-encefálica (Medana *et al.*, 1997), causando a depleção de proteínas plasmáticas, edema perivascular e lesão neuronal, porém o edema cerebral não é frequentemente pronunciado; pelo contrário, o edema cerebral é provavelmente causado pelo aumento do volume sanguíneo secundário ao sequestro dos eritrócitos infectados e pelo aumento do fluxo sanguíneo cerebral. Evidências de autópsias realizadas no Malawi em crianças com malária cerebral sugerem que existe desregulação do sistema de coagulação, com consequente acumulação de trombos microhemorrágicos e de plaquetas nos microcapilares cerebrais. A reduzida deformabilidade dos eritrócitos parasitados contribuem para prejudicar o fluxo microcirculatório e é um forte indício de mortalidade em crianças e adultos (Crawley *et al.*, 2010).

Figura III.3 Mecanismos de interação entre as células endoteliais e plaquetas na malária cerebral



Fonte: Retirado de Schofield & Grau (2005).

Outro receptor endotelial de ligação para *P. falciparum* é a molécula 1 de adesão de células endoteliais e plaquetas PECAM1 [*platelet-endothelial cell adhesion molecule* - (PECAM1)] (Tabela III.2). Uma variante de codificação comum (Leu→Val no codão 125) foi analisada em estudos de caso-controlo de malária grave na Papua

Nova Guiné e no Quênia, mas nenhuma associação significativa foi identificada (Casals-Pascual *et al.*, 2006).

### III.3.3. Rosetting

Em isolados de *P. falciparum* foi demonstrado um fenómeno conhecido como *rosetting* (*formação de rosetas*), que consiste na adesão dos eritrócitos infectados a outros eritrócitos não-infectados (Dondorp *et al.*, 2000; Kwiatkowski, 2005; Moxon *et al.*, 2011). A ligação de dois ou mais eritrócitos infectados e não-infectados foi observada e descrita em culturas *in vitro* de *P. falciparum* (Rogerson *et al.*, 2004; Loscertales *et al.*, 2007) e desde então tem sido reportada em várias espécies de *Plasmodium* (Warrell *et al.*, 1982; Warrell, 1997). Este fenómeno foi observado no sangue periférico de pacientes com malária grave aguda e nas amostras de vasos sanguíneos dos autopsiados vítimas de malária (Ho *et al.*, 1991). Sabe-se que os componentes do soro, tais como: a albumina, fibrinogénio, IgG e IgM, participam na segurança e estabilização da interacção entre os eritrócitos infectados e não-infectados e têm, consequentemente, sido considerados indispensáveis à *formação de rosetas* (Dondorp *et al.*, 2000). O mecanismo para a *formação de rosetas* é também mediado através da ligação da PfEMP-1 ao receptor-1 do complemento do eritrócito - CR1 [erythrocyte complement receptor 1- (CR1)] (Kwiatkowski, 2005; Loscertales *et al.*, 2007). O relato mais importante tem sido a associação entre a capacidade de *formação de rosetas* e a malária grave (Moxon *et al.*, 2011). Esta associação tem sido demonstrada em vários estudos realizados em áreas bastante diferentes, quer nos aspectos epidemiológicos, quer geográficos (Carlson *et al.*, 1994; Heddini *et al.*, 2001; Fowkes *et al.*, 2008). Estudos realizados numa população da Papua Nova Guiné revelaram que aproximadamente 80% da população saudável tinha deficiência em CR1 nos eritrócitos, estando essa deficiência associada tanto ao polimorfismo do gene CR1 como a  $\alpha^+$  talassémia (uma situação comum na referida população) (Cockburn *et al.*, 2004). O mesmo estudo revelou que estes polimorfismos estavam independentemente associados com resistência à malária grave (Cockburn *et al.*, 2004). Dados contraditórios foram obtidos num outro estudo, realizado na Gâmbia, que não evidenciou qualquer associação com a gravidade da doença (Zimmerman *et al.*, 2003).

### III.4. Processos Imunológicos na Patogénese da Malária

Difícilmente se compreende por que motivo algumas infecções maláricas são fatais enquanto outras se resolvem sem complicações (Kwiatkowski *et al.*, 1990; Kwiatkowski, 1999). Apontam-se factores genéticos do hospedeiro como parcialmente responsáveis (Cohen *et al.*, 1974; Greenwood *et al.*, 1991; Kwiatkowski, 1999). Um número considerável de genes associados à resistência e susceptibilidade à malária foram descritos nos últimos 15 anos (Tabela III.2.) (Kwiatkowski, 1999). A interacção genética entre malária e sistema imune é, potencialmente, de enorme interesse prático por duas distintas razões (Kwiatkowski, 2005). Primeiro, embora exista uma vasta literatura sobre as respostas imunológicas à malária em seres humanos e em sistemas de modelos experimentais, as evidências concretas sobre os mecanismos causais de imunidade protectora em populações naturalmente expostas são poucas, constituindo um obstáculo fundamental ao desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a malária. Segundo, a pressão selectiva da malária no eritrócito levou ao aumento da prevalência de distúrbios hematológicos comuns, como: anemia falciforme e talassémia. Advoga-se que uma melhor compreensão destes mecanismos de pressão selectiva que a malária exerce sobre o sistema imune seria útil ao esclarecimento dos fenómenos imunológicos e inflamatórios das doenças crónicas (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003; Kwiatkowski, 2005).

Do ponto de vista fisiopatológico o fenómeno da resistência genética à malária por *P. falciparum* na fase eritrocítica pode envolver um ou mais dos seguintes mecanismos:

- Inibição da entrada (penetração) dos merozoítos nos glóbulos vermelhos;
- Atraso no crescimento intracelular do parasita;
- Prevenção da lise dos eritrócitos - que ocorre no final do processo de maturação do parasita causando a libertação dos merozoítos na circulação sanguínea;
- Aumento da fagocitose dos glóbulos vermelhos parasitados;
- Redução do fenómeno da citoaderência dos eritrócitos infectados às células endoteliais, glóbulos vermelhos não infectados e plaquetas;
- Aumento da resposta imune à “malária-infecção” (Kwiatkowski, 2005).

### III.4.1. A resposta imune

Após a infecção natural, desenvolve-se uma resposta humoral com a produção de anticorpos (com semi-vida de três a quatro semanas) contra os antígenos dos esporozoítos (White, 2003). Em áreas com alta transmissão, os níveis de anticorpos podem tornar-se patentes após 20 a 30 anos, contudo estes não estão correlacionados com a premunicação (White, 2003). Sabe-se no entanto, que é fundamentalmente no ciclo eritrocítico que o sistema imune do hospedeiro responde aos antígenos parasitários com uma resposta imune contra o parasita. A imunidade específica contra determinada espécie de parasita, que decorre durante a fase assexuada, desenvolve-se muito lentamente durante uma infecção natural não tratada, embora esta imunidade possa conferir alguma protecção aquando da reexposição (White, 2003; Kwiatkowski, 2005). Devido à diversidade antigénica e ao polimorfismo das populações parasitárias, a protecção cruzada em relação às espécies é inicialmente débil e desprezível (White, 2003). Para o desenvolvimento de uma resposta imune específica é necessário uma interacção entre células antigénicas TCD4<sup>+</sup> e linfócitos B. Nestas interacções participam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade [*major histocompatibility complex* - (MHC)], receptores de linfócitos T e B e anticorpos (Gilbert *et al.*, 1998; Weatherall *et al.*, 2002; Kwiatkowski, 2005). Contrariamente, à situação da maioria das doenças infecciosas (virais e bacterianas), na malária, a resposta imune protectora não é efectiva (Hill, 1996; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Kwiatkowski, 2005). Várias parecem ser as causas: por um lado, a estrutura dos antígenos parasitários e sua considerável diversidade dificulta a resposta imune influenciando a sobrevivência do parasita e a sua consequente transmissão ao vector; a produção de exo-antígenos e/ou de mediadores celulares produzidos em resposta à invasão parasitária modulam a resposta imune tornando-a menos eficiente e, por outro lado, a localização intracelular do parasita e ausência de moléculas de MHC no eritrócito, concorrem, para que estes proporcionem um meio relativamente favorável ao crescimento de *Plasmodium* (Gilbert *et al.*, 1998; Kwiatkowski, 2005). Estudos recentes sobre o papel das variantes de CD40L [CD40 *ligand*- (CD40L)] na resposta à infecção por *P. falciparum* em humanos demonstraram que as variantes genéticas expressas nos eritrócitos, incluindo deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD),  $\beta$ -globina e Duffy estavam associados à



resistência à malária (Sabeti *et al.*, 2002). CD40L, uma glicoproteína de membrana tipo II expressa nas células T CD4<sup>+</sup>, envolvida na proliferação de células B, na activação de células apresentadoras de antígeno e comutação das imunoglobulinas da classe Ig, parece desempenhar um papel crucial na resposta imune à infecção (Sabeti *et al.*, 2002). A importância da CD40L na regulação imune foi demonstrada pela primeira vez em seres humanos portadores da doença genética ligada ao cromossoma X - Síndrome de hiperimunoglobulina M, em que a ausência de CD40L nas células T activadas diminuía a resposta imune mediada por células e impedia que as células B fossem submetidas à mudança para produção das imunoglobulinas da classe Ig. O fenótipo da doença inclui baixos níveis de IgG e IgA, níveis séricos normais ou elevados de IgM e susceptibilidade a infecções oportunistas (Sabeti *et al.*, 2002). A imunidade à malária envolve tanto a resposta celular como a humoral.

#### III.4.2. Imunidade humoral

Observações do efeito protector de inoculações de purificado de IgG proveniente de adultos africanos, em crianças africanas e adultos tailandeses, indicam que os mecanismos humorais jogam um papel importante na imunidade natural contra a malária (Cohen *et al.*, 1961). Elevados níveis de imunoglobulinas IgE anti-maláricas têm sido associados à redução do risco para a malária, em indivíduos assintomáticos em áreas endémicas (Bereczky *et al.*, 2004). Os anticorpos não estão implicados no crescimento dos parasitas, uma vez alcançados os glóbulos vermelhos, mas sim na invasão dos merozoítos, no bloqueio da citoaderência e na interrupção do fenómeno de *rosetting* (Carlson *et al.*, 1994). Várias observações têm demonstrado que a infecção malárica em indivíduos residentes em áreas endémicas induz uma forte resposta humoral expressa na activação das células B policlonais. As diferentes fracções dos anticorpos são dirigidas contra os distintos estádios de desenvolvimento do parasita ou contra os antígenos codificados no parasita e translocados na superfície da membrana dos eritrócitos infectados. Relatos de observações evidenciam que a resposta imune parece estar dependente da produção de anticorpos pelos linfócitos directamente estimulados pelos antígenos parasitários (Kyes *et al.*, 2001, Kwiatkowski, 2005). Apontam os anticorpos contra os antígenos variantes de superfície [*variante surface*

*antigens* - (VSA)] que se desenvolvem após a malária sintomática, como associados à protecção da infecção nos adultos (Hviid, 2005). Os anticorpos contra os *antígenos de superfície dos eritrócitos infectados* (RESA), uma molécula depositada na membrana dos eritrócitos depois da invasão do merozóito, têm sido implicados na inibição do crescimento de *P. falciparum in vitro* e nas densidades parasitárias significativamente baixas encontradas em adultos liberianos (Ahuja, 2006). Uma alta prevalência, em anticorpos contra o antígeno 1 da membrana apical [*apical membrane antigen 1* (AMA-1)], em todos os grupos etários, com resposta estável, tem sido observada em áreas holoendémicas de malária (Ahuja, 2006), mas a sua correlação com o desenvolvimento da imunidade protectora ainda é controversa. Um dos benefícios da imunidade humoral é também o papel de suporte na resposta terapêutica às drogas antimaláricas durante a fase aguda da doença (Mayxay *et al.*, 2004).

### III.4.3. Imunidade celular

O papel da imunidade celular tem sido exemplificado por extensos estudos em modelos roedores e em humanos, em estudos epidemiológicos, imunológicos e clínicos (Weatherall & Clegg, 2002; Weatherall *et al.*, 2002). Sabe-se que os anticorpos isoladamente são capazes de eliminar os parasitas da circulação, todavia a sua completa erradicação está dependente da acção das células T CD4<sup>+</sup> e das células B (Ahuja, 2006). Observações *in vitro* com mononucleares periféricos revelaram que ambos são activados, com produção tanto de Interferon gama (IFN- $\gamma$ ) [*interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ )] como de TNF- $\beta$  e de subconjuntos das citocinas anti-inflamatórias, tais como as interleucinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (Schlichtherle *et al.*, 1996; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003; Mackintosh *et al.*, 2004). Para além destas, as interleucinas IL-2 e a IL-5, assim como os radicais de oxigénio e óxido nítrico [*nitric oxide* - (NO)] produzidos pelos macrófagos activados, parecem ser os mediadores celulares de maior importância no controlo da infecção plasmodial (Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003; Mackintosh *et al.*, 2004; Boutlis *et al.*, 2006). Estudos em humanos apoiam a associação entre a produção do NO, avaliado indirectamente pela análise dos seus metabolitos e a protecção à malária severa (Mackintosh *et al.*, 2004).

Devido ao papel crucial desempenhado pelo IFN- $\gamma$ , a sua correlação com a protecção à malária tem sido cada vez mais investigada (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002). Dado que os eritrócitos não expressam moléculas I da classe HLA, o papel das células T CD8<sup>+</sup> tem sido considerado restrito à protecção contra a malária na fase pré-eritrocítica. Em cultura *in vitro*, as células T CD8<sup>+</sup> têm sido identificadas na eliminação dos parasitas de hepatócitos infectados. Quanto ao papel das células dendríticas na imunidade celular, o mesmo continua incerto até ao momento (Ahuja, 2006). Estudos precedentes revelaram que a maturação das células dendríticas era suprimida após a exposição aos eritrócitos infectados de *P. falciparum* ou *P. yoelli*, enquanto estudos posteriores apontavam para um papel mais eficiente, demonstrando a activação de células T *naïve* e em particular das células T  $\gamma\delta$  na produção de IFN  $\gamma$  (Artavanis-Tsakonas & Riley, 2002; Ahuja, 2006). Uma prova evidente do papel da imunidade celular na malária decorre de ensaios em voluntários não imunes que foram repetidamente desafiados com injeções de eritrócitos infectados em doses ultra-baixas, demonstrando terem desenvolvido posteriormente imunidade nas infecções subsequentes, apesar de não ter sido detectável resposta mediada por anticorpos (Pombo *et al.*, 2002).

### III.5. Clínica da Malária

A maioria das infecções por *Plasmodium sp.* é clinicamente silenciosa, reflectindo a capacidade adaptativa dos mecanismos imunológicos em prevenir a doença (Schofield & Grau, 2005). No entanto, em indivíduos não imunes (viajantes e crianças menores de cinco anos) as infecções são clinicamente mais evidentes e uma minoria destas aproximadamente 1% segundo Mackintosh (2004), podem tornar-se graves ou potencialmente fatais (Mackintosh *et al.*, 2004). A doença pode manifestar-se como síndrome discreto ou como uma sobreposição de síndromes aparentando múltiplas etiologias. Em caso de morte pode ocorrer o envolvimento de um simples órgão ou, pelo contrário, este ser multiorgânico (Weatherall *et al.*, 2002; Trampuz *et al.*, 2003; Schofield & Grau, 2005).

Os padrões gerais da doença dependem marcadamente da idade e da prévia experiência imunológica do hospedeiro. Em áreas de alta transmissão da malária o

“fardo” é suportado sobretudo por lactentes e crianças pequenas, com risco de vida, sendo o cenário de doença fatal dominado clinicamente por quadros de disfunção respiratória (*distress respiratório*), malária cerebral (MC) e anemia severa da malária (ASM) [*Severe malarial anaemia* (SMA)] (Weatherall *et al.*, 2002; Trampuz *et al.*, 2003; Rogerson *et al.*, 2004; Schofield & Grau, 2005; Crawley *et al.*, 2010). No entanto, em áreas de menor transmissão a infecção primária pode ocorrer tardiamente, na idade adulta. Nestas situações a doença grave traduz-se, com frequência, por distúrbios adicionais tais como *insuficiência renal, edema pulmonar, choque e icterícia*. Alguns estudos reportam como factores determinantes e principais na doença a dinâmica da transmissão, a idade e as respostas imunológica e genética do hospedeiro (Weatherall *et al.*, 2002; Schofield & Grau, 2005).

De acordo com a OMS, define-se *malária não complicada (não grave)*, como: malária sintomática, sem sinais de gravidade ou evidência clínica e/ou laboratorial de disfunção de um ou mais órgãos vitais. Geralmente os sintomas e sinais são inespecíficos. A doença é suspeitada clinicamente, principalmente na base da febre ou de história de febre (WHO, 2010b). A malária é uma doença curável se diagnosticada e tratada precoce e correctamente. No entanto é considerada muitas vezes como uma emergência médica, sobretudo pela rápida progressão para complicações e morte (Warrell, 1997; Weatherall *et al.*, 2002; Trampuz *et al.*, 2003; White, 2003; WHO, 2010b; Crawley *et al.*, 2010).

O período de incubação (i.e. tempo que decorre desde a inoculação dos esporozoítos até ao desenvolvimento dos sintomas) pode ser significativamente prolongado quer, pelo nível de imunidade adquirida por meio de exposições prévias (White, 2003, Trampuz *et al.*, 2003), como pela quimioprofilaxia antimalárica ou pela terapêutica supressiva que pode atenuar, mas não prevenir a doença (Taylor & Strickland, 2000). Dependendo da espécie, pode variar entre sete a trinta dias (períodos mais curtos são atribuídos a infecções por *P. falciparum* e mais longos para *P. malariae*). Têm sido reportadas algumas excepções (White, 2003), por exemplo em relação à malária não *falciparum*, o período de incubação é habitualmente mais longo (media 15-16 dias). Nas infecções por *P. vivax*, o período mais longo de incubação descrito, foi de 30 anos (White, 2003; Trampuz *et al.*, 2003).

Nos indivíduos não-imunes com infecção por *P. falciparum*, o período pré-patente (i.e. tempo que decorre entre a inoculação dos esporozoítos e a detecção da parasitemia) é em média de 10 dias (variando entre 5-10 dias), enquanto o período de incubação é em média de 11 dias (6-14 dias) (Trampuz *et al.*, 2003).

A crise febril clássica da malária geralmente associada a infecção por *P. falciparum* raramente se observa, tendo uma duração muito variável de seis a dez horas. Clínica e tradicionalmente distinguem-se três fases: Fase Fria – de início brusco, caracterizada por calafrios e tremor; Fase Quente - correspondente ao início da febre, acompanhada de cefaleias, vômitos e convulsões, principalmente em crianças, com uma duração de três a oito horas; finalmente a Fase Húmida – caracterizada por sudação abundante, com temperatura normal ou hipotermia e fadiga. Classicamente refere-se que a periodicidade da febre varia em função da espécie. Assim febre “terça” ocorre sobretudo nas infecções por *P. falciparum*, *P. vivax* e *P. ovale* e a Febre “quarta” é comumente atribuível às infecções por *P. malariae*. Constituem exceção as infecções por *P. falciparum* que podem apresentar febre contínua ou muito irregular e sem periodicidade. A febre é um sintoma muito comum, mais de 92% dos doentes a referem sobretudo os não-imunes (Trampuz *et al.*, 2003).

Os sintomas prodrômicos da malária incluem as cefaleias, mialgias, mal-estar geral e tosse, que precedem a típica sequência de “calafrios-febre-sudorese” associados com um paroxismo de febre. Sintomas como náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal podem acompanhar a febre. Estes sintomas são comuns à maioria das síndromes febris prevalentes nas regiões endêmicas de malária. O exame físico pode revelar: temperatura elevada, sudação profusa, astenia marcada, esplenomegalia precoce (particularmente nas infecções por *P. falciparum*, destacando-se nestas a icterícia moderada), hepatomegalia, com uma notável ausência de linfadenopatia e exantema (White & Ho, 1992; Weatherall *et al.*, 2002), aumento da frequência respiratória, anemia moderada, trombocitopenia moderada, aumento das aminotransferases e albuminúria. Em países não endêmicos e naqueles onde a malária é pouco frequente, estes sintomas podem ser atribuídos a infecções virais comuns, como influenza, especialmente quando a malária não é suspeitada (Trampuz *et al.*, 2003). Contrariamente, em países onde a malária é frequente é comum a população reconhecer os sintomas da malária e proceder a automedicação (“tratamento presuntivo”), mesmo na ausência de confirmação do

diagnóstico. Se o esquema de tratamento for incompleto ou se os parasitas forem resistentes ao tratamento administrado pode assistir-se à recrudescência dos parasitas (Weatherall *et al.*, 2002) e causar, uma vez mais, sintomas (Weatherall *et al.*, 2002) ou então evoluir para as formas graves e complicadas (Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003). A OMS recomenda a avaliação e monitorização da parasitemia dos casos tratados (WHO, 2010a; WHO, 2010b; White, 2011).

Com a propagação da farmacoresistência, a OMS tem preconizado a utilização das combinações baseadas na artemisinina como a terapia de primeira linha em situações de malária não complicada/não grave, como em situações de doença grave. Estas ACTs apresentam como vantagem a redução rápida e significativa da biomassa parasitária, a rápida resolução dos sintomas clínicos, actividade efectiva contra *P. falciparum* multirresistente, a diminuição dos portadores de gametócitos e consequente redução da transmissão. Apesar de controversa, têm sido relatadas poucas reacções adversas e fraca resistência do parasita com o uso da artemisinina e seus derivados. Price (1996) referiu como desvantagem da utilização dos ACTs a ausência do efeito hipnozoiticida quando utilizado em monoterapia (Price *et al.*, 1996). Nas tabelas III.3 e III.4, apresentamos sumarizadas as diferentes combinações segundo o nível de utilização, respectivamente as mais utilizadas actualmente e as de pouca utilização.

Tabela III.3. Combinações Baseadas na Artemisinina (ACT) mais comuns

- |   |
|---|
| ▪ Artemether+Lumefantrina                     |
| ▪ Artesunato+Cloroquina (AS+CQ)               |
| ▪ Artesunato+Amodiaquina (AS+AQ)              |
| ▪ Artesunato+Sulfadoxina+Pirimetamina (AS+SP) |
| ▪ Artesunato+Mefloquina (AS+MQ)               |
| ▪ Piperaquina+Dihydroartemisinina             |

Fonte: Retirado e adaptado de WHO (2010a) e WHO (2010b)

Tabela III.4. Outras combinações (ACT) de pouca utilização na África subsariana

▪ Piperaquina+Dihydroartemisinina+Trimetoprim
▪ Piperaquina+Trimetoprim+Dihydroartemisinina + Primaquina
▪ Dihydroartemisinina + Piperaquina
▪ Dihydroartemisinina + Naftoquina; Artesunato + Pironaridina
▪ Artesunato+ Chlorproguanil +Dapsone
▪ Atovaquone +Proguanil+ Artesunato e Beta Arteether / Alfa-Beta Arteether

Fonte: Retirado e adaptado de WHO (2010b) e WHO (2010a)

### III.6. Malária Grave

A maior mudança nos últimos anos foi o reconhecimento (*alguns diriam re-reconhecimento*) (Mackintosh *et al.*, 2004) de que a malária grave predominantemente causada por *P. falciparum* é um distúrbio complexo multi-sistémico, com muitas semelhanças à síndrome de sépsis, traduzido por uma gama variável de quadros clínicos (WHO, 1990; White & Ho, 1992; Warrell, 1997; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Mackintosh *et al.*, 2004; ). Como nos referimos nas secções anteriores, a evolução da malária grave resulta presumivelmente da combinação de factores específicos do parasita, tais como a adesão e sequestro na microcirculação e a libertação de moléculas bioactivas associada à resposta inflamatória do hospedeiro (produção de citocinas, quimocinas e antigénios celulares). A maioria das mortes ocorre devido à malária cerebral e anemia severa da malária (Greenwood, 1997; Bellamy *et al.*, 1998; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Trampuz *et al.*, 2003; Mackintosh *et al.*, 2004; Crawley *et al.*, 2010). Admite-se, contudo, que a globalidade de casos de malária por *P. falciparum* são leves e só aproximadamente 1% evoluem para doença grave (Bellamy *et al.*, 1998; Mackintosh *et al.*, 2004; Breman *et al.*, 2010).

#### a) *Genética da malária grave e patogénese*

Muitos genes parecem estar envolvidos na susceptibilidade do hospedeiro às formas graves de malária por *P. falciparum*, embora, tenha sido identificado um

pequeno número (Bellamy *et al.*, 1998). Hill (1996) referia que tinham sido identificados pelo menos doze genes do hospedeiro humano que contribuíam para variabilidade da resposta inter-individual na susceptibilidade à malária grave (Hill, 1996). Actualmente estão identificados mais de 23.000 genes humanos envolvidos com os diferentes estádios do ciclo da infecção malárica (Weatherall *et al.*, 2002; Weatherall & Clegg, 2002; Mackintosh *et al.*, 2004). Um estudo caso-controlo realizado na Gâmbia, em crianças, concluiu que variantes genéticas do gene da hemoglobina (*HBB*), da G6PD, do HLA classe I e II e TNF $\alpha$ , conferiam uma forte protecção à malária cerebral e anemia (Driss, 2011). Segundo Hill (1992) (*in* Bellamy *et al.*, 1998), a malária tem sido uma força selectiva na manutenção da variabilidade genética de toda a população humana e é provável que muitos outros polimorfismos de genes a serem identificados possam estar envolvidos na susceptibilidade do hospedeiro às formas graves de doença (Bellamy *et al.*, 1998; Dessein *et al.*, 2001).

A actual compreensão dos mecanismos patogénicos da malária grave admite que a combinação de vários processos básicos tais como: a expansão da biomassa de eritrócitos infectados, a destruição de eritrócitos (infectados e não infectados), obstrução microvascular associada ao processo inflamatório, resultando na redução da perfusão tecidular (que conduz a jusante a um processo de trocas metabólicas a nível celular e que exacerbam adicionalmente a situação), concorrem para a celeridade da gravidade da doença (Figura III.4). Estes processos podem ser generalizados com envolvimento tecidular multi-sistémico ou focalizado em órgãos específicos (como o cérebro nos casos da malária cerebral ou a placenta durante a malária na gravidez) (Weatherall *et al.*, 2002; Rogerson *et al.*, 2004).



Figura III.4. Resultado clínico da interacção de vários factores (parasitário, hospedeiro e factores sociogeográficos), na patogénese da malária em África.



Fonte: Retirado e adaptado de Weatherall et al. (2002).

#### b) *Definição e manifestações clínicas de malária grave*

Apesar dos recentes avanços no conhecimento da patogénese da malária grave, não existe uma definição única e satisfatória. De acordo com os mecanismos fisiopatológicos, alguns autores definem malária grave (MG) como uma doença multi-sistémica, caracterizada por uma resposta inflamatória à infecção, traduzida por um Síndrome de Resposta Inflamatória Sistémica (SIRS), manifestada clinicamente por termo-desregulação (febre ou hipotermia), taquicardia, taquipneia e leucocitose com ou

sem desvio à esquerda (White & Plorde, 1991; White, 2003, 2011). A OMS define MG como a situação, em que o paciente apresenta parasitemia assexuada de *P. falciparum* na presença de uma ou mais das seguintes características clínicas e/ou laboratoriais e, exclusão de outras possíveis causas de doença (WHO, 1990, 2000a, 2000b, 2006b, 2010b).

**Achados Clínicos:**

- Alterações da consciência incluindo coma não despertável,
- Prostração i.e. fraqueza generalizada que impossibilita o doente de andar e sentar-se sem ajuda,
- Dificuldade em alimentar-se,
- Convulsões múltiplas – mais do que dois episódios em 24 horas,
- Respiração profunda, respiração acidótica (*distress respiratório*),
- Colapso circulatório ou choque (pressão arterial sistólica <70 mm Hg em adultos e <50 mm Hg em crianças),
- Clínica de icterícia e evidência de disfunção de outro órgão vital,
- Hemoglobinúria,
- Manifestações hemorrágicas espontâneas,
- Edema pulmonar (achados radiológicos).

**Achados Laboratoriais:**

- Hipoglicemia (glucose no sangue <2.2 mmol/l ou <40 mg/dl),
- Acidose metabólica (bicarbonato no plasma <15 mmol/l),
- Anemia severa normocítica (Hb <5 g/dl, Hematócrito <15%),
- Hemoglobinúria,
- Hiperparasitemia (> 2%/100.000/μl em áreas de baixa intensidade de transmissão ou > 5% ou 250.000/μl em áreas de alta intensidade de transmissão estável de malária),
- Hiperlactatemia (lactato > 5 mmol/l),
- Insuficiência Renal (creatinina no soro > 265 μmol/l).

Clinicamente a doença pode traduzir-se por acidose metabólica e manifestar-se por uma respiração acidótica (SDRA) - (um forte indicador de risco de morte na malária grave), hipovolemia (uma característica major da malária grave sobretudo quando

exacerbada pela anemia e obstrução microvascular resultante do sequestro dos parasitas, que pode levar a diminuição do aporte de O<sub>2</sub> aos tecidos, com consequente acidose láctica e metabolismo anaeróbico) (Mackintosh *et al.*, 2004). Em crianças, a malária pode causar prostração ou incapacidade de tomar líquidos por via oral ou ainda, em crianças menores, a incapacidade de mamar. Com a progressão da doença podem surgir uma sequência de síndrome de doença grave, incluindo coma, disfunção respiratória, anemia e hipoglicemia. Em algumas situações a malária grave pode coexistir com bacteremia (White & Plorde, 1991; Weatherall *et al.*, 2002). É comum na admissão ao hospital referirem uma história de doença de apenas alguns dias. Porquanto a avaliação clínica deve sempre procurar excluir outras doenças, em especial infecção respiratória aguda, meningite bacteriana, encefalite, síndrome de Reye e septicemia, que podem ser confundidas com a disfunção respiratória, coma e/ou doença multissistêmica devido à malária. Na prática a exclusão de outras doenças intercorrentes, nas regiões endêmicas, é sempre um procedimento difícil. Apesar da parasitemia ser um guia confiável para a gravidade da doença, existem exceções, por exemplo, no caso de doença grave que ocorre na ausência de uma parasitemia detectável (Weatherall *et al.*, 2002). Sabe-se que a MG pode ocorrer três a sete dias após o início da febre, contudo existem relatos de situações raras de ocorrência de gravidade para a morte após 24 horas do início dos sintomas, em pacientes não imunes (Trampuz *et al.*, 2003). Dados recentes relatam que a MG pode desenvolver-se mesmo depois da resposta inicial ao tratamento e da completa eliminação da parasitemia, sugerindo-se que este fenómeno seja devido à libertação tardia das citocinas (Trampuz *et al.*, 2003). Na Tabela III.1.3. (pag.145) encontram-se sumarizados os indicadores de malária grave e sinais clínicos e laboratoriais de mau prognóstico (WHO, 1990, 2000a, 2000b, 2006b, 2010b).

### III.7. Complicações da Malária Grave

#### III.7.1. Malária Cerebral

A malária cerebral (MC) é a apresentação clínica mais comum e causa de morte em adultos em áreas de baixa endemicidade (Trampuz *et al.*, 2003). Em crianças a anemia severa da malária é a complicação mais comum particularmente em áreas de alta endemicidade, sendo a MC a principal causa de morte (White & Ho, 1992; Miller *et al.*, 1994; Dobbie *et al.*, 2000; Taylor & Strickland, 2000; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003).

O início pode ser dramático, caracterizado por uma convulsão generalizada ou focal, com sonolência e confusão mental inicial, seguido de coma com duração variável de horas a dias (Warrell, 1997; Trampuz *et al.*, 2003). Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a fisiopatologia da malária cerebral, mas nenhuma foi completamente satisfatória. Os relatos não são unânimes em sugerir como evento principal na patogênese da MC o sequestro de eritrócitos parasitados das vénulas pós-capilares da circulação cerebral, apesar da perturbação funcional que leva a encefalopatia não estar ainda bem esclarecida (OMS, 1990; White & Ho, 1992; McGuire *et al.*, 1999; Taylor & Strickland, 2000; Blum & Stephens, 2001; Weatherall *et al.*, 2002). Um excelente argumento descrito por Trampuz (2003), contra a isquemia secundária ao fenómeno referido é a recuperação neurológica pós MC. Como mencionado, a MC é consequência de uma cascata de eventos, envolvendo por um lado a produção de toxinas pelo parasita e por outro, a produção de citocinas pelo hospedeiro e a amplificação de receptores para citoaderência expressos nas células do endotélio capilar cerebral (Dobbie *et al.*, 2000). Em modelos experimentais de animais susceptíveis à MC foram evidenciados altos níveis de TNF $\alpha$ , citocinas que aumentam a expressão de moléculas de adesão do endotélio celular como ICAM-1 ou CD54 (molécula de adesão intercelular), ELAM ou selectina E e VCAM-1 (molécula de adesão celular/vascular) (Warrell, 1997; Ho & White, 1999; Dessein *et al.*, 2001; Artavanis-Tsakonas *et al.*, 2003; Flick & Chen, 2004; Medana & Turner, 2006). Na infecção humana estes e outros antigénios de superfície das células do hospedeiro têm sido imputados como receptores para a citoaderência de eritrócitos parasitados por *P.*

*falciparum*, incluindo trombospondina (proteína da matriz extracelular) e CD36 (antígeno de diferenciação de leucócitos, expresso em células endoteliais) (Warrell *et al.*, 1997; Rogerson *et al.*, 2004).

Segundo a OMS, a definição exacta de malária cerebral requer a presença de parasitémia assexuada de *P. falciparum* num doente em coma não despertável, com uma pontuação menor ou igual a nove segundo a escala de Coma de Glasgow [ou coma score  $\leq 2$  na escala de Blantyre (Glasgow modificado no caso de crianças)] em que foram excluídas outras causas de encefalopatia (i.e. hipoglicemia, encefalite viral/bacteriana/fúngica) (WHO, 1990, 2000a, 2000b, 2006b, 2010b). Para se distinguir a MC do coma *pós-ictus*, o coma da malária deve persistir pelo menos 30 minutos depois de uma convulsão generalizada. Do ponto de vista prático, em países endémicos qualquer alteração do estado de consciência deve ser tratada como MC, mas a punção lombar deve ser realizada para excluir uma meningoencefalite (WHO, 2010b; Trampuz *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2004). Dados recentes sugerem que algumas crianças, ao contrário dos adultos não imunes com MC, podem apresentar hipertensão intracraniana (Weatherall *et al.*, 2002). Para Trampuz (2003), são os adultos não-imunes, os mais propensos a apresentar hipertensão intracraniana. Isto levou a uma reavaliação do risco de punção lombar precoce na exclusão de meningite em crianças em coma com parasitémia, tendo alguns médicos optado pelo adiamento da punção lombar e início do tratamento empírico com antibióticos, em simultâneo com o tratamento antimalárico (Weatherall *et al.*, 2002). Ao exame físico o doente pode apresentar anormalidades neurológicas que se assemelham ao de uma encefalopatia simétrica difusa (Warrell, 1997; Trampuz *et al.*, 2003). São raros os sinais neurológicos focais e a rigidez de nuca. Os reflexos da córnea e da pupila estão habitualmente intactos. As convulsões são uma característica relevante da MC. As crianças podem apresentar convulsões febris simples ou convulsões múltiplas, focais e prolongadas, com características que sugerem um foco de actividade epiléptica (Warrell, 1997; Weatherall *et al.*, 2002). Nos adultos as convulsões, em regra, são generalizadas, com alterações inespecíficas no exame electroencefalográfico (EEG). A tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética nuclear (RMN) mostram muitas vezes evidência de edema cerebral, contudo as lesões focais são pouco comuns (Trampuz *et al.*, 2003). Estão descritas manifestações de delírio, agitação e até mesmo psicose paranóide transitória, que

ocorrem quando o paciente recupera a consciência (Trampuz *et al.*, 2003). Quanto mais profundo e prolongado o coma, pior é o prognóstico (White & Plorde, 1991; Warrell, 1997; Weatherall *et al.*, 2002; Trampuz *et al.*, 2003). Com o agravamento do estado de coma, o paciente não consegue localizar a dor e pode demonstrar uma postura anormal como rigidez de descorticação ou de descerebração e opistótono, alterações pupilares, desvio conjugado dos olhos ou nistagmo (White & Ho, 1992; Warrell, 1997; Trampuz *et al.*, 2003), ausência de reflexos corneanos e anormalidade dos padrões respiratórios (Weatherall *et al.*, 2002), incluindo hipoventilação e respiração irregular. A hemorragia retiniana ocorre em cerca de 15 % dos casos (Warrell, 1997) e está associada ao coma eminente se o doente permanece consciente e ao mau prognóstico nos casos de malária cerebral (Looareesuwan *et al.*, 1983; Warrell, 1997). Tem sido descrito como comum, a hipersalivação (Weatherall *et al.*, 2002, White, 2003; Crawley *et al.*, 2010).

Os sinais de progressão da MC são muito variáveis, a doença pode evoluir para paralisia dos nervos cranianos e afectação do tronco cerebral que culmina com paragem respiratória (Trampuz *et al.*, 2003). A maioria dos sobreviventes (> 97% adultos e > 90% crianças), não têm anormalidades neurológicas após a alta hospitalar (Trampuz *et al.*, 2003). Em crianças a recuperação da MC ocorre, normalmente, dentro de 48 horas, (White & Ho, 1992), embora uma minoria significativa (5 a 10%) sofra de sequelas neurológicas (Warrell *et al.*, 1982; Warrell, 1997; Weatherall *et al.*, 2002), têm sido descritas como mais comuns, a hemiplegia, ataxia, disfagia, dificuldade na audição, alterações visuais, incluindo cegueira cortical ou epilepsia (Warrell, 1997; Weatherall *et al.*, 2002). Mais de metade dessas crianças pode evoluir para recuperação completa, apesar de apresentarem, na alta hospitalar, sinais residuais de disfunção neurológica incluindo alterações da função cognitiva e do comportamento. Outras sequelas neurológicas descritas, incluem as anormalidades de nervos cranianos e tremores extrapiramidais (Warrell, 1997; Trampuz *et al.*, 2003).

### III.7.2. Anemia Severa da Malária

Outra manifestação da MG por *P. falciparum* é a *anemia severa da malária* (ASM) (McGuire *et al.*, 1999; English, 2000; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003;

Casals-Pascual *et al.*, 2006; Ehrhardt *et al.*, 2006; WHO, 2010b). Vários estudos demonstram que a ASM é claramente multifactorial, existindo um forte argumento de que a destruição de eritrócitos e eritropoiese ineficaz jogam ambas um papel fundamental na sua etiologia (White & Ho, 1992; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003).

A fisiopatologia da ASM é uma área de estudo complexa e das mais negligenciadas (Weatherall *et al.*, 2002). Alguns estudos reportam que a malária, *per si*, parece justificar as causas do aumento da destruição e da diminuição da produção dos glóbulos vermelhos (Weatherall *et al.*, 2002; Casals-Pascual *et al.*, 2006). Os eritrócitos infectados podem ser fagocitados pelos macrófagos, após opsonização por imunoglobulinas e/ou componentes do complemento (McGuire *et al.*, 1999; Weatherall *et al.*, 2002). As opiniões sobre a fisiopatologia são muitas e controversas, mas, para alguns investigadores, o processo patogénico da ASM é multifactorial e só em parte explicado pela destruição directa de eritrócitos parasitados (McGuire *et al.*, 1999; WHO, 2010b; Weatherall *et al.*, 2002).

#### **a) *Aumento da lise dos eritrócitos***

Na malária aguda os eritrócitos são destruídos directamente pela infecção parasitária (Mackintosh *et al.*, 2004). Porém, o grau da anemia não pode ser somente explicado por este processo. Sabe-se que os eritrócitos não-parasitados são removidos da circulação por fagocitose e lise mediada pelo complemento, resultante da deposição de imuno-complexos e activação do complemento (Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Mackintosh *et al.*, 2004). Estudos recentes sugerem que os eritrócitos em crianças com ASM apresentam níveis significativamente reduzidos de proteínas reguladoras de complemento (Mackintosh *et al.*, 2004). Estas protegem os glóbulos vermelhos, da destruição, quer por remoção da circulação dos imuno-complexos, quer por regulação da cascata de activação do complemento (Mackintosh *et al.*, 2004).

#### **b) *Produção reduzida de eritrócitos***

Sabe-se que no decurso da infecção por *P. falciparum*, geralmente os níveis de reticulócitos são inadequadamente baixos (Mackintosh *et al.*, 2004), reflectindo a

supressão da resposta normal a eritropoietina (Epo). A(s) causa(s) da eritropoiese anormal nos casos de malária por *P. falciparum* é incerta. Vários estudos têm demonstrado uma associação entre elevados níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias: TNF- $\alpha$ , interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e anemia severa da malária (Miller *et al.*, 1994; Casals-Pascual *et al.*, 2006). No entanto, a supressão da eritropoiese, *in vitro*, ocorre somente com níveis de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  bem acima dos observados em ensaios clínicos; além disso, a supressão da eritropoiese mediada por citocinas parece não estar associada com anormalidades morfológicas observadas no desenvolvimento da população eritróide (Weatherall *et al.*, 2002). A reticulocitopenia tem sido observada em numerosos estudos clínicos de anemia malárica. O estudo histopatológico da medula óssea de crianças com anemia mostrou hiperplasia eritróide, com diseritropoiese citoplasmática e esboços nucleares irregulares (Weatherall *et al.*, 2002). A eritropoietina sérica (Epo) foi adequadamente avaliada num estudo em crianças africanas com ASM. Contudo, outros estudos em adultos da Tailândia e Sudão concluíram que, a concentração de Epo, embora aumentada, era inadequada para o grau de anemia. As concentrações de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  têm sido correlacionadas com a gravidade da doença, estando os níveis elevados de TNF- $\alpha$  associados à supressão da eritropoiese. Essas citocinas podem contribuir para a redução da produção da Epo e aumento da eritrofagocitose (Miller *et al.*, 1994; Weatherall *et al.*, 2002). Várias linhas de investigação mostram que a eritropoiese pode ser fortemente perturbada por mediadores inflamatórios como, o TNF- $\alpha$ . *In vitro*, o TNF- $\alpha$  suprime a proliferação das células progenitoras dos eritrócitos em culturas de medula humana. *In vivo*, a eritropoiese é inibida pela exposição crónica ao TNF- $\alpha$  (Weatherall *et al.*, 2002). Um estudo de caso-controlo realizado em crianças na Gâmbia demonstrou que o alelo HLA de classe I, HLA-B53 e os alelos da classe II - HLA-DRB1-1302 estavam associados à protecção contra a ASM (McGuire *et al.*, 1999).

### **c) *Definição e características Clínicas da ASM***

A OMS define ASM como uma anemia cuja concentração de hemoglobina (Hb) é inferior a < 50g/L (5g/dl), na presença de parasitémia assexuada de *P. falciparum* e ausência de qualquer outra causa identificável (WHO, 1990, 2000a, 2006b, 2010b).



A anemia é tipicamente normocítica e normocrômica, com uma notável ausência de reticulócitos, contudo é comum a presença de microcitose e hipocromia em muitas áreas endêmicas, sobretudo nas regiões em que se confirma uma frequência muito elevada de  $\alpha$  e  $\beta$  talassémias e/ou deficiência de ferro (Weatherall & Clegg, 2002). Dados reportados sugerem que a anemia pode agravar-se após o início do tratamento, especialmente em situações de alta parasitemia (Weatherall *et al.*, 2002). Outro aspecto pertinente e ponderado como factor de risco para a anemia da malária é a desnutrição (Ehrhardt *et al.*, 2006). Estudos realizados em áreas endêmicas da África subsariana em crianças sugerem que a desnutrição pode influenciar a susceptibilidade para a doença e parece ser um importante factor de risco para a anemia mais do que a própria malária *per se* (Ehrhardt *et al.*, 2006). Estão descritos como sinais e sintomas da anemia, a dispneia, letargia, palidez, taquipneia e taquicardia. Com a progressão e o agravamento da anemia podem surgir manifestações de insuficiência cardíaca como ritmo de galope, hepatomegalia e fervores crepitantes (English, 2000). Na prática, apesar de as crianças estarem profundamente anémicas têm relativamente poucos sintomas, quando comparados com o alto risco de morte, se não forem imediatamente transfundidas. Na maioria das situações a hemotransfusão é recomendada unicamente na base do resultado do nível de hemoglobina (English, 2000).

### III.7.3. Insuficiência Respiratória e Acidose Metabólica

A síndrome de stresse respiratório agudo (SDRA) [*acute respiratory distress syndrome* (ARDS)] é uma manifestação frequente da malária grave e um indicador de mau prognóstico (WHO, 1990, 2000a; White, 2003; WHO, 2006b, 2010b). Clinicamente traduzida por taquipneia, respiração profunda e ofegante, seguida de hipoxemia e insuficiência respiratória grave necessitando de apoio ventilatório. A insuficiência respiratória aguda (IRA) geralmente ocorre alguns dias após o início da doença, mas pode surgir súbitamente ou mesmo depois de resposta inicial ao tratamento antipalúdico e da eliminação da parasitemia. O edema pulmonar é geralmente não-cardiogénico e pode evoluir para SDRA, geralmente devido ao aumento da permeabilidade capilar pulmonar (White & Ho, 1992; WHO, 2000a; White, 2003; Trampuz *et al.*, 2003). Na

MG, a IRA é definida como o aparecimento súbito de um infiltrado pulmonar bilateral com desequilíbrio da razão ventilação/perfusão  $\leq 300$  mmHg e uma pressão da artéria pulmonar  $\leq 18$  mmHg, sem evidências de hipertensão arterial. A SDRA é definida pela presença de lesão pulmonar aguda associada a uma relação da fracção da tensão arterial de oxigénio inspirado menor de 200 mmHg. A radiografia de tórax pode apresentar um infiltrado difuso pulmonar bilateral e nodularidade confluyente peri-hilar (Trampuz *et al.*, 2003). Esta complicação da MG raramente ocorre em infecções por *P. vivax* e *P. ovale*. Dados recentes reportam que a maioria das crianças com complicações respiratórias da malária tem associada anemia severa e acidose metabólica secundária a reduzida capacidade de transporte de oxigénio e por este motivo a reposição à transfusão de sangue fresco é geralmente eficaz (Weatherall *et al.*, 2002). Contrariamente, em mulheres grávidas e adultos não imunes com malária, a transfusão deve ser administrada com precaução e deve efectuar-se monitorização hemodinâmica. Dados diferentes revelam que uma minoria de crianças com insuficiência respiratória não responde às medidas apropriadas de ressuscitação sugerindo-se que esta ausência de resposta pode estar associada a insuficiência renal, a infecção bacteriana sistémica ou a síndrome de disfunção multi-sistémica. A reduzida capacidade de transporte de O<sub>2</sub> condiciona o aparecimento da taquipneia, respiração profunda e ofegante e como compensação a utilização dos músculos respiratórios secundários traduzindo-se numa acidose respiratória (Weatherall *et al.*, 2002). Outra manifestação de mau prognóstico e importante causa de morte na malária grave é a acidose metabólica severa (Day *et al.*, 2000), resultante dos seguintes factores: glicólise anaeróbica nos tecidos do hospedeiro com interferência do sequestro parasitário no fluxo microcirculatório, produção parasitária de lactato, hipovolemia, insuficiência hepática e “clearance” do lactato renal (Day *et al.*, 2000; Breman *et al.*, 2010). Segundo Weatherall (2002), a acidose é em grande parte devida ao excesso de ácido láctico (lactato  $> 5$  mmol/l), embora outros aniões possam contribuir. Por exemplo a toxicidade atribuída ao uso inadequado dos salicilatos (Aspirina) em crianças enquanto no domicílio, para tratarem a síndrome febril, também pode contribuir para uma acidose metabólica (Weatherall *et al.*, 2002).

### III.7.4. Hipoglicemia

A hipoglicemia (glucose no sangue  $< 2.2$  mmol/l ou  $< 40$  mg/dl) é uma manifestação frequente da MG, sobretudo em crianças e mulheres grávidas (WHO, 2010b; White, 2003; Weatherall *et al.*, 2002; Breman *et al.*, 2010). É muitas vezes negligenciada porque os sintomas da hipoglicemia (ansiedade, dispneia, taquicardia, sudorese profusa, coma, convulsões generalizadas e alterações posturais) são também típicos da MG e confundem-se com a própria doença. (Trampuz *et al.*, 2003). A hipoglicemia pode ser uma forma de apresentação da MG ou pode ocorrer durante o tratamento com quinina (Bruce-Chwatt, 1982; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Breman *et al.*, 2010). Em crianças com níveis adequados de insulina a hipoglicemia foi atribuída a uma disfunção da gliconeogénese hepática e ao aumento do consumo de glicose nos tecidos periféricos e pelos parasitas (Weatherall *et al.*, 2002; Breman *et al.*, 2010). Nos adultos a hipoglicemia tem sido frequentemente associada à hiperinsulinemia e postula-se que os alcalóides da Cinchona (quinina/quinidina) parecem estimular directa ou indirectamente as células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas (Bruce-Chwatt, 1982; Weatherall *et al.*, 2002; Trampuz *et al.*, 2003). Relatos de outros investigadores sugerem que a hipoglicemia pode ser encontrada em pacientes adultos com níveis normais de insulina (Trampuz *et al.*, 2003). No entanto, seja qual for a sua patogénese, a glicemia deve ser monitorizada em todos os pacientes gravemente doentes com malária e a hipoglicemia tratada precoce e agressivamente (Weatherall *et al.*, 2002; Trampuz *et al.*, 2003).

### III.7.5. Insuficiência Renal

A insuficiência renal (IR) (creatinina  $> 265$   $\mu$ mol) é igualmente uma manifestação comum da MG, particularmente dos adultos não imunes, sendo rara em crianças (WHO, 2000a; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Breman *et al.*, 2010). A insuficiência renal aguda é geralmente oligúrica ( $< 400$  ml/dia) ou anúrica ( $< 50$  ml/dia), raramente não oligúrica e pode exigir diálise temporária (Weatherall *et al.*, 2002; Trampuz *et al.*, 2003; White, 2003). O sedimento urinário geralmente é normal

(WHO, 2000a). Ocasionalmente pode mostrar cilindros granulosos e hialinos, mas não eritrocitários (WHO, 2000a). Em casos graves ocorre necrose tubular aguda secundária à isquemia renal (White & Ho, 1992; Trampuz *et al.*, 2003), contudo a glomerulonefrite é rara (Weatherall *et al.*, 2002; Breman *et al.*, 2010). Apesar da controvérsia, alguns estudos sugerem que em determinadas situações a necrose tubular aguda pode ser precipitada pela hemólise intravascular (Weatherall *et al.*, 2002). Outros advogam que a hemólise intravascular maciça e hemoglobinúria resultante, que ocorre na febre das águas negras "*blackwater fever*", é uma condição transitória e não é acompanhada por insuficiência renal (Trampuz *et al.*, 2003).

### III.7.6. Hipotensão e Choque

O colapso circulatório ou *choque*, definido pela OMS como pressão arterial sistólica < 70 mm Hg em adultos e < 50 mm Hg em crianças, é uma manifestação comum em crianças e adultos com MG (WHO, 2000a; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Breman *et al.*, 2010; WHO, 2010b). A hipotensão severa pode desenvolver-se de modo súbito, geralmente com edema pulmonar, acidose metabólica, sépsis e/ou hemorragia massiva secundária à ruptura esplênica ou do trato gastrointestinal (Trampuz *et al.*, 2003). A maioria dos pacientes em choque exibe uma baixa resistência vascular periférica e um débito cardíaco elevado. A função de bomba cardíaca parece muito bem preservada, apesar do intenso sequestro de eritrócitos parasitados na microcirculação miocárdica. A hipotensão postural também pode ser secundária à disfunção do sistema nervoso autônomo.

### III.7.7. Outras Anormalidades Hematológicas

Para além da ASM, já revista, têm sido descritos outros transtornos hematológicos importantes, nomeadamente alterações nos glóbulos brancos, plaquetas e

na coagulação, no decurso da malária aguda grave (WHO, 2000a; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Breman *et al.*, 2010).

#### **a) *Leucócitos***

Em relação aos glóbulos brancos, vários estudos demonstram que existem na malária efeitos significativos sobre a função leucocitária. A malária pode ser acompanhada por uma leucocitose moderada e em alguns casos pode ocorrer também uma leucopenia. Ocasionalmente têm sido observadas reacções do tipo leucemóide (Weatherall *et al.*, 2002). A leucocitose periférica (leucócitos  $> 12.000/\text{mm}^3$ ) tem sido associada à doença grave e considerada pela OMS como um indicador laboratorial de mau prognóstico (WHO, 1990, 2000a, 2006b, 2010b). A presença elevada de neutrófilos pode sugerir uma infecção bacteriana intercorrente (White & Plorde, 1991; White, 2003). Uma monocitose e um aumento do número de linfócitos circulantes podem ser observados em pacientes com infecção aguda, porém o significado dessas alterações não está suficientemente esclarecido (WHO, 2000a; Weatherall *et al.*, 2002). Tem sido demonstrado que existe também uma significativa disfunção de células mielóides. Trabalhos recentes têm elucidado como eritrócitos infectados podem modular a função dos macrófagos e células dendríticas mielóides, através da adesão de células infectadas aos receptores CD36 e/ou CD51, nas células do hospedeiro (Weatherall *et al.*, 2002). Por outro lado, a função dos monócitos e macrófagos pode ser inibida pela acção da hemozoína resultante da hemoglobina digerida (Weatherall *et al.*, 2002). Estas observações sugerem que a inibição da fagocitose e de outras respostas inflamatórias mediadas por adesão de eritrócitos infectados às células mielóides e pela ingestão de hemozoína pode influenciar o resultado de infecção e facilitar a sobrevivência de ambos, parasita e hospedeiro (Weatherall *et al.*, 2002).

#### **b) *Plaquetas***

A trombocitopenia é comum, mas geralmente não está associada a hemorragias (WHO 2000a; Weatherall *et al.*, 2002; White, 2003; Trampuz *et al.*, 2003; Breman *et al.*, 2010). Considerada quase invariável na malária, alguns pesquisadores sugerem que, embora não específica de infecção activa, poderia ser útil como um marcador sensível.

A trombocitopenia grave ( $<50 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ ) é rara (Weatherall *et al.*, 2002). Estudos reportam que o aumento da remoção de plaquetas parece surgir após a absorção de complexos imunes, mas não há qualquer evidência de alo-anticorpos específicos contra plaquetas (Weatherall *et al.*, 2002). À semelhança do que acontece com a eritropoiese, parece existir um defeito na trombopoiese, contudo este fenómeno não foi estabelecido. Embora a trombocitopenia não esteja associada à gravidade da doença, tem sido demonstrado que as plaquetas contribuem para a patogénese da malária em humanos e em modelo experimental. Como explicação para este fenómeno pensa-se que os baixos níveis de plaquetas, para além de constituírem um marcador de carga parasitária, podem também ter um efeito protector contra a doença grave (Aitman, 2000; Weatherall *et al.*, 2002).

### **c) Alterações da coagulação**

A coagulação intravascular disseminada (CID) tem sido relatada em menos de 10% dos pacientes com MG nas áreas endémicas (Trampuz *et al.*, 2003). Outros estudos relatam a ocorrência de CID em 30% dos doentes com malária importada nas zonas temperadas (Clemens *et al.*, 1994; Losert *et al.*, 2000; Bruneel *et al.*, 2003; Liechti *et al.*, 2003). Os marcadores laboratoriais da CID incluem o aumento da concentração dos produtos de degradação da fibrina (D-dímero), baixa concentração do fibrinogénio, tempo prolongado de protrombina (aumento do valor do INR) e baixa contagem de plaquetas (Liechti *et al.*, 2003). São observações comuns as anormalidades da hemóstase em testes laboratoriais, sugerindo activação em cascata dos transtornos da coagulação. Estes ocorrem particularmente em adultos, no decurso de malária aguda grave. Os pacientes podem apresentar sangramento no local da injeção ou hemorragia nas mucosas e em situações mais graves gangrena periférica simétrica (Liechti *et al.*, 2003). Alguns estudos sugerem não existir evidência histológica da deposição de fibrina intravascular nos indivíduos que morrem de MG e coagulação intravascular disseminada (Weatherall *et al.*, 2002). No entanto, outras investigações demonstraram a presença de trombos de fibrina na biópsia de pele em pacientes com gangrena simétrica periférica (Anuradha *et al.*, 1999; Keri *et al.*, 2000) e deposição de fibrina na microcirculação capilar de múltiplos órgãos em achados *pos-mortem* (Liechti *et al.*, 2003) sugerindo, a existência de múltiplos factores jogando um papel crucial no

desenvolvimento da necrose tecidual e gangrena periférica simétrica, em casos de malária grave associada a CID (Liechti *et al.*, 2003).

### III.8. Tratamento

#### III.8.1. Tratamento da Malária Grave

A malária grave é uma emergência médica, devendo ser tratada em unidade de tratamentos intensivos (UTI) (Weatherall *et al.*, 2002; WHO, 2010b). Quando não diagnosticada, a mortalidade (particularmente na malária cerebral) é de 100% (WHO, 2010b), se tratada em fase precoce, correctamente com antimaláricos eficazes associados a medidas de suporte vital, a mortalidade pode diminuir para 15 a 20% (Mackintosh *et al.*, 2004; WHO, 2010b). A abordagem de um doente com malária grave exige quatro etapas fundamentais: Avaliação clínica do paciente, tratamento antimalárico específico, terapia coadjuvante e medidas de suporte vitais (WHO, 2000a, 2006b, 2010b). Como emergência médica exige a administração imediata de quimioterápicos antimaláricos de acção rápida. A via parenteral é a preferencial, em doses calculadas em função do peso do doente e da substância base activa do antimalárico (mg base/kg de peso) (WHO, 2010b), na impossibilidade, utilizar como alternativa, a via oral através da sonda nasogástrica, a via intramuscular (IM) e rectal (supositórios). Esta última tem sido recomendada sobretudo em crianças com o uso dos derivados da artemisinina. De acordo com as recomendações da OMS (WHO, 2006b; 20010a, 2010b), duas classes de medicamentos para uso parenteral devem ser utilizados no tratamento farmacológico da malária grave: a) alcalóides da Cinchona – quinina e quinidina; b) derivados da artemisinina – artesunato, artemeter e artemotil. Considerados os níveis de resistência documentados de *P. falciparum* às drogas antimaláricas, não são recomendados, actualmente, o uso da cloroquina e da sulfadoxina-pirimetamina no tratamento da MG (WHO, 2006b, 2010a; WHO, 2010b).

### III.8.2. Tratamento da Malária por *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax*

Embora não estando bem caracterizada a resistência de *P. ovale* e *P. malariae* aos antimaláricos, considera-se que estas duas espécies são geralmente sensíveis à cloroquina, mesmo depois, de ter sido reportada resistência de *P. malariae* a este fármaco num estudo realizado na Indonésia (Trampuz *et al.*, 2003). Em relação a *P. vivax*, está devidamente comprovada resistência à cloroquina, mas a sensibilidade aos demais antimaláricos necessita de monitorização.

Devida à presença de hipnozoitos nas espécies *P. ovale* e *P. vivax*, o tratamento da malária, nestes casos, deve ser completo e estabelece a utilização do regime padrão associada a primaquina (Baird & Hoffman, 2004; WHO, 2006b, 2010a; 2010b).



## **IV. FACTORES DO HOSPEDEIRO HUMANO NA SUSCEPTIBILIDADE/RESISTÊNCIA À MALÁRIA**

### **IV.1. Introdução**

O estudo da genética tem proporcionado uma grande preocupação aos pesquisadores na identificação de potenciais genes de susceptibilidade às doenças infecciosas (Blackwell, 2001; Dessein *et al.*, 2001). A disposição de determinados fenótipos clínicos associados às doenças infecciosas, diferenças raciais em susceptibilidade e estudos realizados em gémeos, têm contribuído para a visão de que o genótipo do hospedeiro concorre para a gravidade da doença (Blackwell, 2001; Dessein *et al.*, 2001). Um exemplo extremo foi a lepra, onde uma forte agregação familiar levou à convicção precoce no passado, de que a lepra era uma desordem conduzida pela genética (Blackwell, 2001). Outros estudos de base populacional têm, também, contribuído para esta percepção: as doenças infecciosas podem actuar como uma forte influência selectiva na modelação da evolução humana e da estrutura genética da população. O exemplo mais evidente é a interacção entre malária e as anemias falciforme e talassémia, sugerindo que a vantagem da presença dos alelos mutantes nos heterozigóticos parece ser compensadora dos efeitos deletérios dessas doenças nos homozigóticos (Greenwood *et al.*, 1991; Hill, 1996, 2001; Blackwell, 2001; Weatherall *et al.*, 2002; Weatherall & Clegg, 2002). Haldane (1948) testemunhou uma frequência extremamente elevada de talassémia em grupos raciais de regiões do Mediterrâneo, sugerindo que a doença teria estado sob efeitos de selecção devido à vantagem selectiva dos heterozigóticos em relação à malária (*in* Min-Oo & Gros, 2005).

Dados da OMS apontam que 5% da população mundial é portadora de genes que causam hemoglobinopatias e, em cada ano, nascem aproximadamente 300 mil crianças com hemoglobinopatias importantes, dos quais mais de 200 mil são africanas com anemia falciforme (OMS, 2006a, 2006b; WHO, 2006a, 2008b).

A percepção de que existe uma relação entre a protecção à malária e os factores hereditários remonta há mais 100 anos, quando Klebs & Tomassi (1887), (*in* Roberts *et al.*, 2010), realizaram na América do Norte um estudo que demonstrou uma aparente

resistência à malária nos descendentes de africanos (Roberts *et al.*, 2010). No entanto, a hipótese formulada por A. E. Garrod (*in* Roberts *et al.*, 2010) considerava que os factores constitucionais estavam subjacentes à variação individual da resposta à doença infecciosa (Dolo *et al.*, 2005; Roberts *et al.*, 2010). Desde a década de cinquenta têm sido atribuídas as altas prevalências das duas anemias hereditárias, assim como da deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) à protecção selectiva dos heterozigóticos contra os efeitos deletérios da infecção por *P. falciparum*. As teorias clássicas de Haldane (1948-49) e Allison (1954) sobre a vantagem selectiva do heterozigótico são tradicionalmente aceites, especialmente a alusiva ao gene da anemia falciforme e a distribuição das áreas endémicas de malária. Uma similaridade entre a distribuição geográfica da  $\alpha$ -talassémia e a incidência de malária em algumas regiões, também tem sido demonstrada, se bem que os mecanismos de protecção dos heterozigóticos talassémicos não estejam completamente compreendidos (Di Nuzzo & Fonseca, 2004). Diferenças na susceptibilidade à malária entre os diferentes grupos étnicos sugerem que os polimorfismos genéticos do hospedeiro contribuem para o desfecho da infecção (Dolo *et al.*, 2005). A marcada variação de susceptibilidade observada em adultos não-imunes foi acolhida como evidência de uma contribuição genética. O peso da doença devido à malária que afectou o mundo durante muitos séculos parece ter contribuído para a selecção natural de uma série de características (traços) muito visíveis e de grande importância médica, incluindo os alelos de genes que codificam a hemoglobina, as enzimas dos glóbulos vermelhas e as proteínas de membrana. Como seria expectável, o próprio ciclo de vida muito complexo do parasita no hospedeiro humano promove o aparecimento de outros genes que também podem influenciar a resposta à infecção, incluindo alguns que modulam as respostas imunes e outros que codificam as proteínas endoteliais (Di Nuzzo & Fonseca, 2004; Dolo *et al.*, 2005; Min-Oo & Gros, 2005).

Na infecção por *P. falciparum* a resistência genética para a fase eritrocítica, tem sido extensamente documentada, mas a associação do antígeno linfocitário humano [*human leukocyte antigen* - (HLA)] à protecção sugere que as variantes genéticas de susceptibilidade/resistência podem desenvolver-se durante a fase hepática da infecção (Hill, 1991; Roberts *et al.*, 2010). Alguns estudos demonstraram que a resistência genética na fase eritrocítica conduziu à selecção de defeitos genéticos nos glóbulos

vermelhos, implicando uma pressão selectiva positiva, com aumento da frequência de genes superior a um por cento (>1%). Estes defeitos incluem as hemoglobinopatias (Ex: hemoglobinas S, C, E e talassémias), defeitos da membrana dos eritrócitos (Ex: ovalocitoses do Sudoeste Asiático, algumas formas de eliptocitoses) e anormalidades metabólicas [Ex: deficiência em glicose-6-fosfato dehidrogenase (G6PD) e em piruvato cinase (PK)] (Hill, 1991; Min-Oo & Gros, 2005; Williams, 2006a, 2006b; Zanella *et al.*, 2007; Hedrick, 2011).

#### IV.1.1. Polimorfismo Eritrocitário

O glóbulo vermelho é o centro do ciclo de vida do parasita da malária (Williams, 2006a). Não só proporciona ao parasita os nutrientes e abrigo, mas muitas das características patogénicas da doença estão relacionadas com as interacções entre os glóbulos vermelhos infectados, não infectados e outros tecidos (Williams, 2006a). Muitos estudos genéticos associados com a protecção à malária descritos até ao momento estão relacionados com genes de estrutura ou de função dos glóbulos vermelhos, apesar de os resultados terem pouca aplicação prática (Williams, 2006a, 2006b). Todas as etapas do ciclo de vida do *Plasmodium* são potencialmente vulneráveis às variações genéticas do hospedeiro que podem interferir quer no desenvolvimento do processo quer na evolução da própria doença (Williamson & Cover, 1971; Williams, 2006a). Segundo Zimmerman (2003), pensa-se que alguns polimorfismos de membrana do eritrócito são competentes em reduzir a invasão do merozoíto de *P. falciparum*, aumentando desse modo a resistência à doença pelo hospedeiro humano. Em meados dos anos 1970 as pesquisas de natureza molecular com *P. knowlesi* sobre as interacções entre as proteínas de superfície de membrana do eritrócito e o parasita permitiram alguns avanços na compreensão e identificação do polimorfismo eritrocitário (Cavasini, 2001; Zimmerman *et al.*, 2003; Min-Oo & Gros, 2005; Williams, 2006a, 2006b; Bonifácio & Novaretti, 2009).

#### IV.1.2. Distúrbios Genéticos

Estudos epidemiológicos em humanos e experiências em modelos animais têm demonstrado que factores genéticos jogam um papel crucial na determinação do início dos sintomas, na progressão, no tipo de manifestação clínica e no desfecho da infecção. O efeito protector de variantes polimórficas de proteínas estruturais específicas de eritrócitos ou de enzimas metabólicas, identificadas durante o ciclo eritrocitário do parasita no hospedeiro humano, constitui uma clara ilustração desta modulação genética e sugere uma co-evolução muito longa do parasita com o hospedeiro humano em áreas endémicas de malária (Min-Oo & Gros, 2005; Williams, 2006b). Factores do hospedeiro humano, relacionados com o polimorfismo de antígenos de grupos sanguíneos [sistema sanguíneo Gerbich (antígeno-negativo), sistema sanguíneo Duffy (antígeno-negativo) e sistemas sanguíneos MNS e ABO], e com a estrutura e função dos glóbulos vermelhos [polimorfismos de genes de receptores de complemento (CR1), ovalocitose do Sudoeste asiático, deficiência em piruvato cinase (PK), deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), hemoglobinopatias C, E e S, e  $\alpha$ -talassémia], têm sido tradicionalmente estudados e relacionados com a susceptibilidade e gravidade à malária (Min-Oo & Gros, 2005; Williams, 2006a, 2006b; Bonifácio & Novaretti, 2009). Na tabela IV.1, estão sumarizados os polimorfismos de eritrócitos mais comuns e melhor caracterizados, que envolvem proteínas específicas e enzimas de eritrócitos, reportados como protectoras da malária (Min-Oo & Gros, 2005; Williams, 2006a).

Tabela IV.1. Mecanismos de variantes eritrocitárias mais comuns na protecção à malária

Variantes Eritrocitárias	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>
	Invasão/crescimento	Fagocitose	Caso-Controllo
<b>Variantes Estruturais da Hemoglobina</b>			
<b>HbAS</b>	↓Invasão/multiplicação (baixa concentração O <sub>2</sub> )	↑Susceptibilidade à fagocitose	Protecção: contra a malária severa (60-90%); mortalidade 50%
<b>HbAC</b>	Normal	N/A	Redução do risco: malária clínica (29%); malária severa (47-80%)
<b>HbCC</b>	↓Multiplicação	↑ Susceptibilidade à fagocitose	Redução do risco de malária clínica (90%)
<b>HbAE</b>	↓Invasão parasitas (25%)	↑ Susceptibilidade à fagocitose	Redução do risco de complicações (OR 6,9)
<b>HbEE</b>	↓Invasão/multiplicação	↑ Susceptibilidade à fagocitose	N/A
<b>As Talassémias</b>			
<b>α-Talassémia</b>	Invasão normal ↓Multiplicação	Sem diferença dos controlos	Redução do risco de malária severa
<b>β-Talassémia</b>	Inconclusivo	↑ Susceptibilidade à fagocitose	Protecção à admissão hospitalar para a malária (50%)
<b>Enzimas dos Glóbulos Vermelhos</b>			
<b>Deficiência em piruvato cinase (PK)</b>	Desconhecido	Desconhecido	Desconhecido
<b>Deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)</b>	↓ Crescimento sob stresse oxidativo	↑ Susceptibilidade à fagocitose (fase em anel)	Protecção das mulheres (heterozigóticas) à malária não severa; protecção dos homens e mulheres (Htz) à malária severa (50%)

↓ - diminuição; ↑ - aumento; Htz -heterozigóticos; N/A-não aplicável

Fonte: Retirado e adaptado de Min-Oo & Gros (2005) e Williams (2006a).

## IV.2. Polimorfismo Genético Relacionado com Drepanocitose ou Anemia de Células Falciformes

A anemia de células falciformes (também chamada de anemia drepanocítica ou drepanocitose) está associada à homozigotia do alelo da hemoglobina S (*HbS*) (OMS, 2006a, 2006b; WHO, 2006a, 2008b). Dados históricos de investigações pregressas advogam que a doença confere uma esperança de vida muito curta [actualmente a expectativa de vida para a população americana, com anemia falciforme, é de 42 anos para os homens e 48 anos para as mulheres (Di Nuzzo & Fonseca, 2004)], enquanto ao portador do traço falciforme (heterozigótico *HbAS*) confere um fenótipo não grave, sem sintomas específicos. Sabe-se que a variante *HbS* não parece diminuir o risco de infecção por *P. falciparum*, mas evidencia ser protector contra as formas graves de doença, provavelmente porque dificulta a invasão e crescimento dos parasitas no interior dos eritrócitos (Pasvol *et al.*, 1978; Min-Oo & Gros, 2005); no entanto a malária é muitas vezes fatal em indivíduos *HbSS*. Algumas teorias defendem que a protecção contra a infecção parece funcionar de modo dose-dependente do alelo *HbS* (Ashley-Koch *et al.*, 2000) (i.e. indivíduos *HbSS* têm um risco ainda menor de infecção do que indivíduos *HbAS*) (Ashley-Koch *et al.*, 2000). Acredita-se que a frequência anormalmente elevada do traço falciforme (*HbAS*), em indivíduos de descendência africana e mediterrânea, é resultante da resistência inata à malária conferida aos portadores da variante *HbS*, durante a fase crítica da primeira infância, favorecendo assim a sobrevivência do hospedeiro e consequentemente a transmissão do gene *HbS*. A selecção evolucionária pela malária (Flint *et al.*, 1998) é notável em dois aspectos: primeiro, a pressão selectiva é muito forte, sendo esse facto evidenciado pelas altas frequências do alelo *HbS* em populações expostas à malária apesar das consequências fatais para os homozigóticos; segundo, populações diferentes têm desenvolvido respostas evolutivas independentes à malária, e isto é observado tanto a nível local como global (Kwiatkowski, 2005). O exemplo mais impressionante é o gene *HBB*, no qual três codificações diferentes num único nucleótido [*Single nucleotide polymorphism* - (SNPs)] parecem conferir protecção contra a malária: Glu6Val (*HbS*), Glu6Lys (*HbC*) e Glu26Lys (*HbE*) (Kwiatkowski, 2005). O alelo *HbS* é comum em África, mas raro no Sudeste Asiático, enquanto o oposto é verdadeiro para o alelo *HbE* (Kwiatkowski,

2005). No entanto, um quadro mais complexo de observação local foi exemplificado pelo povo do Dogon no Mali, que apresentou uma frequência muito menor do alelo *HbS* do que a maioria de outros grupos africanos da região ocidental, apresentando uma alta frequência do alelo *HbC* (Agarwal *et al.*, 2000). Outro nível de complexidade é que em África, o alelo *HbS* é encontrado em quatro haplótipos distintos (Lapoumeroulie *et al.*, 1992) enquanto Zago (2000) refere cinco haplótipos (Zago *et al.*, 2000). As diferenças observadas têm sido geralmente interpretadas como se a mesma mutação tivesse surgido de modo independente em quatro populações diferentes de África, apesar de outros investigadores terem apontado outras explicações (Flint *et al.*, 1998). As diferentes distribuições geográficas de talassémia, G6PD, ovalocitose e do antígeno Duffy-negativo são outros exemplos do princípio geral de que a partir de diferentes populações evoluíram diferentes variantes genéticas de protecção à malária. O facto de diferentes alelos de resistência à malária terem surgido em diferentes regiões sugere que o forte processo de vantagem selectiva contra a malária ocorreu recentemente na história evolucionária humana e, certamente, desde que o homem iniciou a sua emigração de África. Isto é sustentado por análises recentes no genoma humano (Kwiatkowski, 2005), que evidenciam a presença dos genes  $\beta^s$  originários de África em diferentes partes do continente Americano e Europeu e uma proporção de haplótipos associados, que parece estar relacionado com as várias migrações de populações africanas para estes continentes (Torres *et al.*, 2005). Estudos antropológicos associados às análises biomoleculares sugerem que o alelo *HbS* tenha surgido entre os períodos Paleolítico e Mesolítico, aproximadamente há 50 ou 100 mil anos na região centro-oeste de África, Índia e leste da Ásia (Torres *et al.*, 2005).

#### IV.2.1. Gene *HBB*

O gene da  $\beta$ -globina está localizado no braço curto do cromossoma 11. É um membro da família do gene da globina, um grupo de genes envolvidos no transporte de oxigénio ( $O_2$ ) (Ashley-Koch *et al.*, 2000). Outros membros desta família incluem os genes  $\alpha$ -,  $\gamma$ -  $\delta$ -,  $\epsilon$ -, e genes da globina  $\xi$ -. Os genes da globina têm um desenvolvimento regulado, de tal modo que certos genes são expressos em momentos específicos durante o desenvolvimento humano (Ashley-Koch *et al.*, 2000). Nos estágios embrionários o

tetrâmero de hemoglobina consiste de duas cadeias  $\epsilon$  (cluster  $\beta$ ) e duas  $\zeta$  (cluster  $\alpha$ ). No início da oitava semana de gestação as cadeias produzidas são gradualmente substituídas pela cadeia  $\alpha$  adulta e duas diferentes cadeias fetais, designadas  $G\gamma$  e  $A\gamma$ . As cadeias  $\gamma$  diferem somente na presença da glicina ou alanina na posição 136, respectivamente. (Clark & Thein, 2004; Torres *et al.*, 2005). A Hemoglobina fetal (HbF) ( $\alpha^2\gamma^2$ ) torna-se a hemoglobina predominante ao longo do período fetal, podendo persistir até a idade adulta em pequenas percentagens. Após o nascimento, as cadeias  $\gamma$  gradualmente são substituídas pelas cadeias  $\beta$  e  $\delta$ . Após o nascimento, por volta do sexto mês, 97% a 98% da hemoglobina é formada pelo tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$  (Hb A), enquanto Hb A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) está presente em aproximadamente 2% a 3%. Sabe-se que as duas cadeias de proteínas  $\beta$ -globina combinam-se com duas cadeias de proteínas  $\alpha$ -globina e um heme para formar a hemoglobina (Hb) predominantemente encontrada em adultos humanos. São reportadas mais de 475 variantes do gene  $\beta$ -globina e várias podem resultar em doença com potencial risco de vida (Zago *et al.*, 2000). Em relação à variante *HbS*, os indivíduos de ascendência africana exibem uma maior frequência do genótipo associado com *HbS*. Contudo, os indivíduos do Mediterrâneo, Caraíbas, Centro-Americanos, Árabes e de descendência indiana também podem exibir risco semelhante (Ashley-Koch *et al.*, 2000). Estudos realizados por Zago (2000) revelaram a identificação através de seis diferentes enzimas de restrição, de cinco haplótipos para o gene  $\beta^s$  e denominados conforme a origem geográfica: Benin, Bantu, Senegal, Camarões e Asiático (ou Indiano-Asiático) (Zago *et al.*, 2000). A prevalência geográfica dos genes  $\beta^s$  associados com os haplótipos específicos tem sugerido origens independentes das mutações  $\beta^s$  nas referidas regiões. A maioria dos cromossomos com o gene  $\beta^s$  tem um dos cinco haplótipos comuns, mas em alguns pacientes (5%-10%) podem ser encontrados haplótipos menos comuns denominados como “haplótipos atípicos” (Zago *et al.*, 2000). Estes haplótipos são provavelmente gerados por uma variedade de mecanismos genéticos como mutações simples ou duplas trocas entre dois haplótipos típicos  $\beta^s$  ou mais frequentemente entre um típico haplótipo  $\beta^s$  e um diferente haplótipo A, nos locais de restrições (Zago *et al.*, 2000). O polimorfismo associado ao gene  $\beta^s$  tem comportamentos nitidamente diferentes na expressão clínica da anemia falciforme, bem como nas variações de respostas às drogas (Zago *et al.*, 2000).





#### IV.2.2. Características clínicas da anemia de células falciformes ou drepanocitose

A anemia de células falciformes (i.e. *sickle haemoglobin*-HbS) é uma doença de carácter genético, de transmissão autossómica recessiva descrita por Herrick (1910) (*in* Di Nuzzo & Fonseca, 2004), associada a três grandes categorias de manifestações: anemia hemolítica crónica, fenómenos vaso-oclusivos e susceptibilidade à infecção (Labie & Elion, 2005). É um dos mais importantes distúrbios genéticos nos seres humanos resultante da ocorrência de uma mutação pontual (CD6A> T) no códão 6 do gene que codifica a cadeia  $\beta$ -globina da hemoglobina (Hb); esta mutação decorre da substituição de um ácido glutâmico (Glu) na Hb normal (HbA) por uma valina (Val) na cadeia  $\beta$ -globina (HbS), ( $\beta^{\text{Glu6Val}}/\beta^{\text{s}}$ -gene) (Clark & Thein, 2004; Makani *et al.*, 2007). Quando desoxigenada, a *HbS* forma grandes polímeros insolúveis que afectam tanto a estrutura global como as propriedades funcionais e reológicas dos eritrócitos. A polimerização leva à característica forma em foice dos eritrócitos que contém a hemoglobina S (Weatherall *et al.*, 2002). A doença falciforme refere-se a um grupo de condições caracterizadas pela presença da HbS que possui três genótipos com significado clínico importante (HbSS, HbSC e HbS/ $\beta^0$ ) (Clark & Thein, 2004; Makani *et al.*, 2007). Os portadores da variante *HbS* são protegidos da infecção por *Plasmodium* (*HbAS* é > 90% protector contra a malária grave e 50% protector contra a malária não grave) (Williams, 2006a). Segundo teorias referidas em parágrafos anteriores, provavelmente, esta protecção tem sido responsável pela elevada frequência desta variante em africanos e em indivíduos de ascendência mediterrânea que apresentam taxas inferiores de mortalidade por malária, quando comparados com os não portadores (HbAA) (Williams *et al.*, 2005a; 2005b). A anemia falciforme é caracterizada por uma grande variabilidade entre os indivíduos portadores do genótipo *HbS*. Sabe-se que factores que modificam a concentração intra-eritrocitária da hemoglobina S podem influenciar a *expressão clínica* da doença, assim como a quantidade e composição da hemoglobina F e sua associação com outras variantes estruturais ou talassémias do tipo  $\alpha$  e  $\beta$ , para além de factores ambientais (Torres *et al.*, 2005; Makani *et al.*, 2007). O quadro clínico é resultante do fenómeno da “foicelização” dos glóbulos vermelhos que ao adquirirem a forma de foice não conseguem circular adequadamente na microcirculação, resultando tanto em

obstrução do fluxo sanguíneo capilar, como na própria destruição precoce. Este mecanismo fisiopatológico leva ao surgimento de graves manifestações clínicas que ocorrem com maior frequência a partir dos seis meses de idade, porquanto durante os seis primeiros meses de vida as crianças são geralmente assintomáticas devido aos altos níveis de hemoglobina F (Di Nuzzo & Fonseca, 2004; Makani *et al.*, 2007). Clinicamente são descritas as seguintes manifestações (Tabela IV.2).

Tabela IV.2. Manifestações clínicas mais frequentes da anemia de células falciformes

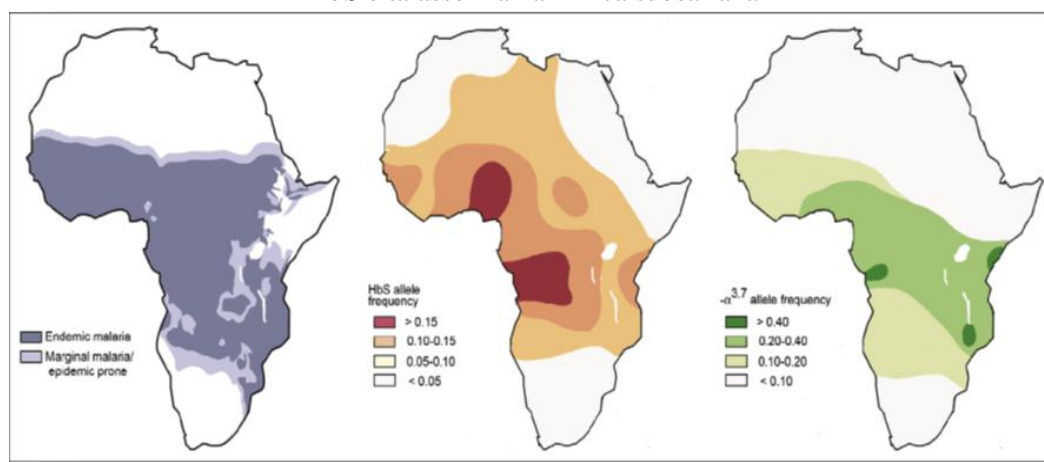
▪ Crises vaso-oclusivas
▪ Necrose avascular da medula óssea (Crises álgidas/síndrome mão-pé/necrose da cabeça do fêmur)
▪ Auto-esplenectomia – com filtração esplênica alterada (aumento do risco de infecções por <i>Haemophilus influenzae</i> e <i>Streptococcus pneumoniae</i> )
▪ Fibrose progressiva do baço (esta pode-se considerar enquanto parte da anterior)
▪ Osteomielite
▪ Síndrome torácico agudo
▪ Vasculopatia cutânea (úlceras crônicas)
▪ Priapismo
▪ Retinopatia proliferativa
▪ Acidente vascular cerebral
▪ Disfunção renal (tubulopatia/Insuficiência renal crônica)
▪ Sequestro dos glóbulos vermelhos (agudo e crônico)
▪ Atraso no desenvolvimento e crescimento (puberdade)
▪ Hemólise e anemia ( $Hg \leq 6 \text{ g/100 ml}$ )
▪ Hiperbilirrubinemia, icterícia e pigmento biliar
▪ Hiperplasia medular e crises de aplasia induzida por Parvovírus humano B19

Fonte: Retirado e adaptado de Makani et al. (2007); Di Nuzzo & Fonseca (2004); Torres et al. (2005)

### IV.3. Outras Hemoglobinopatias - Talassémias

As  $\alpha$  e a  $\beta$ - talassémias são consequência das supressões ou mutações pontuais na porção não-codificadora dos genes da globina, causando uma síntese inadequada das cadeias alfa e beta da globina ( $\alpha$ - ou  $\beta$ -globina) (Min-Oo & Gros, 2005). Uma frequência surpreendentemente elevada dessas mutações, encontradas originalmente no Mediterrâneo, levou Haldane (1949) a propor a sua “hipótese malárica” atribuindo a persistência desses alelos ao efeito protector natural contra a doença, no estado de heterozigotia (*in* Min-Oo & Gros, 2005). Segundo Haldane (1949), os heterozigóticos talassémicos teriam vantagem selectiva em relação aos normais quanto à malária, enquanto os homozigóticos talassémicos morreriam em consequência da própria doença. Altas prevalências de portadores  $\alpha$ -talassémia também têm sido encontradas em regiões endémicas de malária, evidenciando uma protecção selectiva e correlação directa entre esse tipo de talassémia e a infecção por *Plasmodium* (Min-Oo & Gros, 2005; Williams, 2006a) (Figura IV.2), contudo os mecanismos de protecção dos  $\alpha^+$  talassémicos em relação à malária permanecem pouco claros. Estudos recentes apontam que crianças  $\alpha^+$  talassémicas apresentam maior susceptibilidade à infecção por *P. vivax*, nos dois primeiros anos de vida, conferindo desse modo maior resistência à infecção por *P. falciparum* quando mais velhas e mais adultas (Min-Oo & Gros, 2005). Um estudo de caso-controlo recentemente realizado em África, que avaliou a protecção da  $\alpha$ -talassémia numa localidade onde a frequência do fenótipo se aproximou dos 50%, revelou que a protecção à malária grave foi observada em indivíduos heterozigóticos. (Min-Oo & Gros, 2005). A alta prevalência de portadores do gene  $\beta$  talassémico em algumas populações humanas, independente do seu alto coeficiente selectivo, evidencia a existência de mecanismos homeostáticos que mantêm o polimorfismo dessa hemoglobinopatia.

Figura IV.2. Correlação entre a incidência geográfica da malária e a frequência alélica *HbS* e talassémia na África subsariana



Fonte: Retirado de Williams (2006a).

#### IV.4. Enzimopatias Eritrocitárias

A deficiência em piruvato cinase (PK) e em glucose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) são as mais comuns deficiências enzimáticas eritrocitárias, resultando em anemia hemolítica (Zanella & Bianchi 2000; Valentini *et al.*, 2002). A PK está envolvida no último passo da via glicolítica das células, levando à produção de piruvato e adenosina trifosfato (ATP). Por sua vez, o seu substrato (fosfoenolpiruvato – PEP) e o produto piruvato estão envolvidos em várias cadeias energéticas e biossintéticas, pelo que a regulação precisa da actividade desta enzima é crucial para o metabolismo global da célula (Valentini *et al.*, 2002; Zanella *et al.*, 2007). Em humanos a deficiência em PK é a causa mais comum da anemia hemolítica não esferocítica hereditária (Zanella & Bianchi, 2000) e vários polimorfismos intragénicos no *locus* da PK foram já descritos. Recentemente, em modelo de roedor, a deficiência em PK determinada por uma mutação (269T-A) foi associada com a susceptibilidade à malária. Em humanos o gene *PK* tem 2060bp e codifica 574 aminoácidos, está localizado no braço longo do cromossoma 1 (Satoh *et al.*, 1988), sendo a região codificada distribuída por 12 exões. A mutação PK<sup>269A</sup>, também está descrita em humanos (van Solinge *et al.*, 1997; Zanella & Bianchi, 2000; Valentini *et al.*, 2020), desconhecendo-se no entanto se, à semelhança dos ratinhos, têm algum papel protector na malária humana. A possibilidade de a

deficiência em PK estar associada à malária em humanos foi recentemente analisada, em estudos *in vitro*, tendo-se verificado uma significativa redução na multiplicação de *P. falciparum* em cultura. Até ao momento, frequências elevadas desta deficiência em áreas endémicas de malária não foram registadas, porém não foram realizadas análises ou pesquisas sistemáticas nesse sentido e a informação existente em relação as populações africanas é claramente limitada. Outra enzimopatia eritrocitária é a deficiência em G6PD. As mutações que reduzem a actividade da G6PD têm sido associadas com protecção à infecção malárica. O efeito benéfico destas mutações poder-se-á dever à redução do crescimento parasitário no interior dos eritrócitos, por induzir uma fagocitose mais eficiente das células parasitadas ou porque as células deficientes em G6PD são mais frágeis ao dano oxidativo induzido pelo parasita do que as células normais (Yuthavong *et al.*, 1990). Uma abordagem mais exaustiva sobre o tema seguir-se-á no capítulo seguinte.

#### IV.5. Outros Polimorfismos Eritrocitários

Estudos genéticos conduziram à descoberta de que uma proteína de membrana de eritrócito era constituída pela proteína Duffy - um receptor de invasão crucial para *P. knowlesi* nos símios e *P. vivax* nos humanos (Zimmerman *et al.*, 2003; Williams, 2006a, 2006b; Bonifácio & Novaretti, 2009). Actualmente é o alvo de uma vacina contra a doença por *P. vivax* (Williams, 2006a; Galinski & Barnwell, 2008). Apesar de *P. falciparum* não necessitar desta via crucial de invasão, utilizando vias alternativas, a história do antígeno-Duffy define um antecedente para a crença de que a compreensão dos mecanismos dessas vias poderá levar a intervenções semelhantes (Min-Oo & Gros, 2005; Williams, 2006a). No sistema do grupo sanguíneo Duffy, o gene FY está localizado no locus 1q<sup>22</sup>-q<sup>23</sup>, é responsável pela glicoproteína Duffy, também chamado de antígeno Duffy receptor para quimocina – ADRC - [*Duffy Antigen Receptor for Chemokines* - (DARC)] expressa quer em células sanguíneas eritróides como em não-eritróides (Bonifácio & Novaretti, 2009). A glicoproteína Duffy é também receptora de citoquinas nos eritrócitos e liga-se a uma variedade de quimiocinas pró-inflamatórias agudas e crónicas, incluindo interleucina 8 (IL-8), MGSA (*melanoma growth-*

*stimulating activator*), MIP-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$* ) e Rantes (*Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted*) (Bonifácio & Novaretti, 2009). A ausência da proteína Duffy nos eritrócitos, que corresponde ao fenótipo FY -1, -2 ou Duffy negativos, é predominante nos africanos que possuem o alelo FY2. Este alelo apresenta uma mutação na região promotora do gene, abolindo a expressão da proteína apenas nas hemácias. O FY2 é fracamente expresso nos eritrócitos. Segundo esta hipótese, os indivíduos Duffy negativos seriam resistentes à malária por *P. vivax* (Cavasini, 2001; Williams, 2006a; Bonifácio & Novaretti, 2009). Dados recentes e contraditórios demonstraram infecção por *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos nos isolados de Angola e Guiné Equatorial (Mendes *et al.*, 2011), Brasil, Quênia (Milner *et al.*, 2009) e Madagascar (Ménard *et al.*, 2010), sugerindo que *P. vivax* teria utilizado outros receptores como alternativa para invasão dos glóbulos vermelhos Duffy-negativos (Milner *et al.*, 2009; Mendes *et al.*, 2011).

Recentemente uma nova abordagem genética levou à identificação de uma via que pode ser importante em algumas populações: o grupo sanguíneo Gerbich-negativos (Ge<sup>-</sup>), que resulta da depleção no exão 3 do gene que codifica a glicoforina C (GYPC $\Delta$ ex3). Este tem sido encontrado com muita frequência nas regiões endêmicas de malária da Papua Nova Guiné e implicado na resistência à doença (Williams, 2006; Bonifácio & Novaretti, 2009).

Em relação ao sistema de grupo sanguíneo ABO, cuja expressão antigénica depende da actividade da glicosiltransferases específicas codificadas no gene ABO, localizado no cromossoma 9q34.1-34.2., a sua importância está associada à prática clínica e transfusional, apesar da sua fisiologia não estar completamente esclarecida. Recentemente foram publicadas evidências de que variações nas glicosiltransferases ABO aumentam o risco às infecções por *P. falciparum*, enquanto o grupo O protege dessa infecção (Bonifácio & Novaretti, 2009; Verra *et al.*, 2009).

## **V. POLIMORFISMO GENÉTICO RELACIONADO COM A DEFICIÊNCIA EM GLUCOSE - 6 - FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD)**

### **V.1. INTRODUÇÃO**

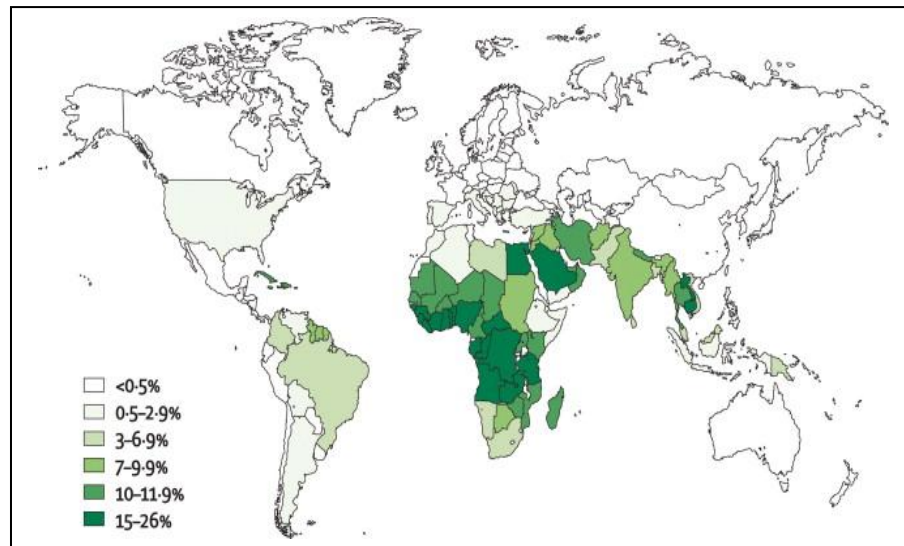
A deficiência em Glucose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) é a enzimopatia mais comum nos humanos, estimando-se que cerca de 400 milhões de pessoas em todo o mundo são portadoras de, pelo menos, uma mutação responsável pela reduzida actividade enzimática (Glader *et al.*, 2010; Hedrick, 2011). A distribuição global desta desordem enzimática é muito semelhante à da malária apoiando, a hipótese de a deficiência em G6PD conferir uma protecção parcial contra a doença-malária (Cappellini & Fiorelli, 2008). Na África subsariana existem três variantes que apresentam frequências polimórficas: G6PD B, G6PD A, G6PD A<sup>-</sup> (Galiano *et al.*, 1990; May *et al.*, 2000). A variante G6PD A<sup>-</sup> é a mais comum e relacionada com manifestações esporádicas de anemia hemolítica (May *et al.*, 2000; Cappellini & Fiorelli, 2008). O defeito enzimático da G6PD foi descrito pela primeira vez por Carson (1956), que descobriu a ocorrência de anemia hemolítica ocasionada pela ingestão de drogas oxidantes (primaquina) em soldados negros norte americanos com malária (*in* Ruwende & Hill, 1998; *in* Cappellini & Fiorelli, 2008). A prevalência desta enzimopatia varia entre 5% a 25% em áreas de elevada endemicidade como África, Médio Oriente, Ásia, Mediterrâneo e a Papua Nova Guiné, incidências entre 0,5% e 6,9% foram descritas respectivamente nas Américas do Norte e do Sul. Assiste-se, actualmente, a um aumento da prevalência dos alelos deficientes particularmente no Norte e Sul da América e Norte da Europa, devido à migração (Greene *et al.*, 1993; Cappellini & Fiorelli, 2008) (Figura. V.1).

Essa enzimopatia é causada por mutação no gene codificante para *G6PD* localizado no cromossoma X. A expressão fenotípica é mais frequente em homens hemizigóticos e mulheres homozigóticas e têm padrão de herança recessiva ligado ao sexo. Para que ocorra a expressão total dos seus efeitos adversos, a mutação nos cromossomas não deve ser antagonizada por um cromossoma X normal, por isso o



homem expressa com maior intensidade a deficiência por ser sempre hemizigótico. Na mulher, a expressão da doença também pode ocorrer desde que os dois cromossomas apresentem genes mutados.

Figura: V.1. Mapa de distribuição mundial da deficiência em G6PD



Fonte: Retirado de WHO (1989) e Cappellini & Fiorelli (2008)

A correlação geográfica da sua distribuição com a endemicidade histórica da malária sugere que a frequência do gene aumentou devido à selecção natural exercida pela malária. No entanto, as tentativas de confirmação do seu papel protector têm originado resultados muito controversos, não sendo claro se, quer os homens hemizigóticos, quer as mulheres heterozigóticas estão protegidos ou se, como é frequentemente sugerido, apenas as mulheres. Contudo, desconhece-se o nível dessa eventual protecção (Ruwende *et al.*, 1995; Mehta *et al.*, 2000).

## V.2. Função Enzimática da G6PD

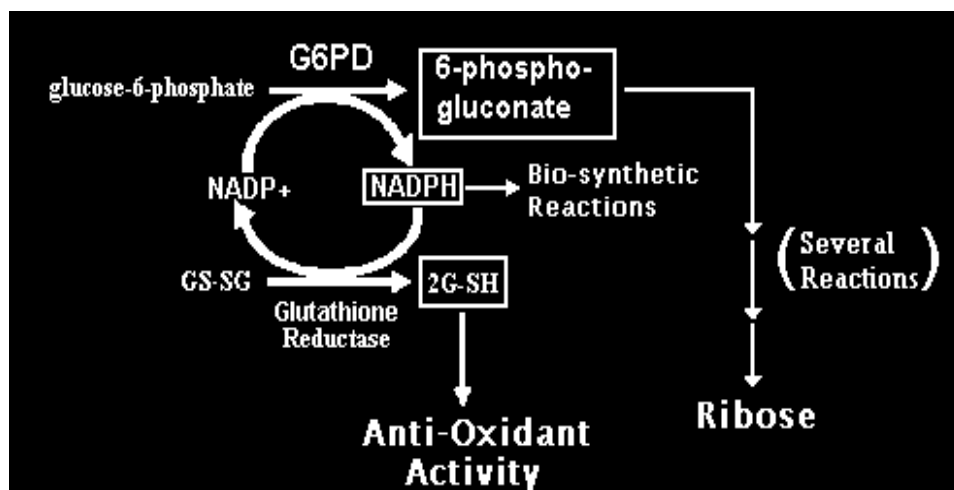
A G6PD é uma enzima citoplasmática, expressa em todos os tecidos e essencial à sobrevivência das células ao stresse oxidativo. A G6PD catalisa o primeiro passo da cadeia de hexose monofosfato que mantém o equilíbrio redox da glutathione. É uma enzima que actua na via aeróbia do catabolismo da glicose, transformando a glicose-6-

fosfato em 6-fosfogluconato, com redução simultânea da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADP) à nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (Figura V.2), (Costa *et al.*, 1997; Mehta *et al.*, 2000; Cappellini & Fiorelli, 2008). Esta via é responsável pelo catabolismo de apenas cerca de 5% do total da glicose consumida pelo eritrócito, o que torna evidente não ser esta a via essencial no catabolismo da glicose, como forma de obtenção de energia (Costa *et al.*, 1997; Mehta *et al.*, 2000). Está claro que a sua principal importância é a obtenção de NADPH, que entra no ciclo da glutatona. A NADPH é equivalente a um doador de electrões (co-factor) (Cappellini & Fiorelli, 2008) para muitas reacções biossintéticas e responsável pela manutenção do equilíbrio intracelular, entre a glutatona reduzida (GSH) e a glutatona oxidada (GSSG), permitindo a destoxificação das células (Figura V.2). Este ciclo é de crucial importância para o eritrócito. Os glóbulos vermelhos contêm concentrações relativamente altas de GSH, um tripeptídeo sulfidril - que actua como um agente redutor intracelular que protege a célula contra os danos das substâncias oxidativas, tais como: radicais de oxigénio e o peróxido de hidrogénio, que são formados no interior dos eritrócitos como consequência das reacções de oxidação da hemoglobina, podendo também ser produzidos através de factores exógenos como: drogas e infecções (Glader *et al.*, 2010).

Em circunstâncias normais, não ocorre nenhuma acumulação de oxidantes, desde que estas combinações sejam inactivadas rapidamente pela GSH, em conjugação com a peroxidase de glutatona. Estas reacções resultam na conversão de GSH a GSSG. Níveis de GSH serão restabelecidos pela enzima redutase da glutatona que catalisa a redução de GSSG à GSH. Esta reacção requer a NADPH gerada pela G6PD. A interacção entre o desvio da hexose monofosfato (HMP) com o metabolismo da glutatona é fundamental para proteger as proteínas intracelulares dos danos das substâncias oxidativas. Desse modo quase todos os episódios hemolíticos estão relacionados com o desvio alterado da HMP e do metabolismo da glutatona resultante da deficiência em G6PD. Raramente a hemólise resulta da deficiência enzimática da síntese da GSH (Glader *et al.*, 2010). O monómero de G6PD é composto de 515 aminoácidos, com um peso molecular de cerca de 59 kDa (Cappellini & Fiorelli, 2008). A G6PD é uma enzima que só é activa como tetrámero ou dímero e o seu equilíbrio é dependente do pH. Cada monómero consiste em dois domínios: domínio N-terminal

(aminoácidos 27-200), com sítio de ligação dinucleotídico  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  (aminoácidos 38-44), e um segundo domínio maior,  $\beta$ + $\alpha$ , composto por nove fitas em dobras anti-paralelas (Mehta *et al.*, 2000; Hedrick, 2011).

Figura V.2. Representação esquemática da via das pentoses-fosfato. Ressalta a importância da G6PD na produção de GSH reduzida, da ribose e da NADPH



Fonte: Retirado de Yoshida & Beutler (1986).

NADP<sup>+</sup> = Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo Fosfato

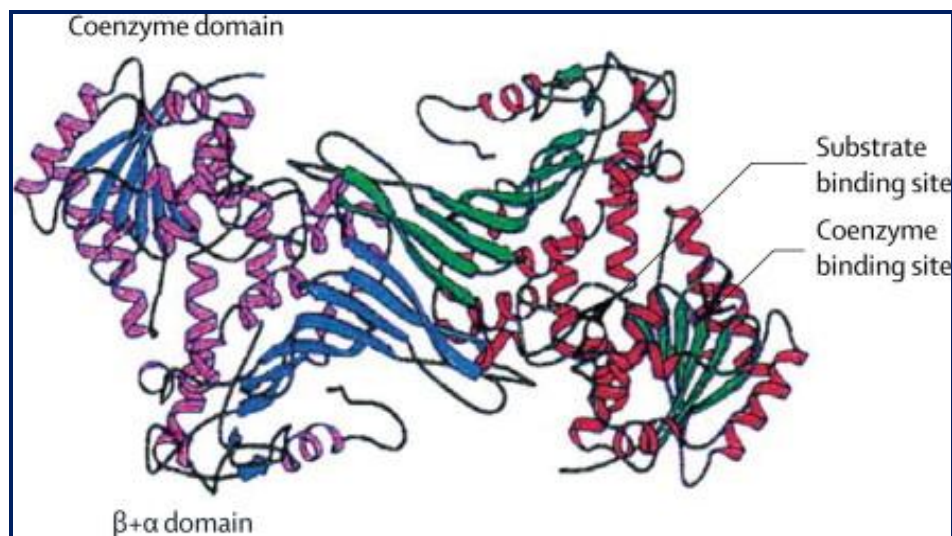
NADPH = Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo Fosfato Reduzida

GS-SG = Glutathione Oxidada

G-SH = Glutathione Reduzida

A interface do dímero encontra-se ligada a esta segunda parte da molécula de G6PD. Os dois domínios estão ligados através da cadeia  $\alpha$ , que actua como substrato de ligação local (aminoácidos 198-206). A estabilidade da estrutura é crucial para a actividade da G6PD normal (Cappellini & Fiorelli, 2008). Na Figura V.3. apresentamos um modelo da estrutura tridimensional da G6PD, que foi publicado em 1996 por Naylor (1996) e, posteriormente, adaptado por Mehta *et al.*, (2000) e Cappellini & Fiorelli (2008).

Figura V.3. Modelo tridimensional de um dímero da G6PD. Duas subunidades idênticas em torno de um eixo simétrico



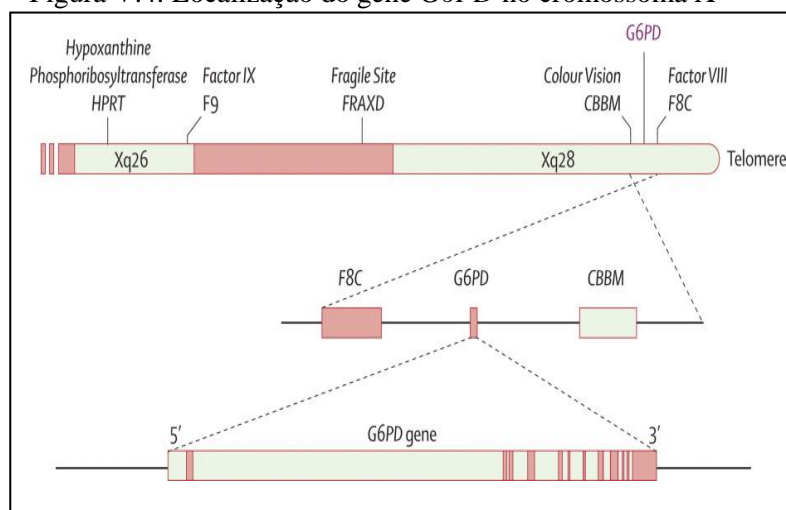
Fonte: Retirado de Naylor et al. (1996) e adaptado por Cappellini & Fiorelli (2008).

### V.3. O Gene

O gene (*Gd*) da G6PD clonado em 1986, está localizado na região telomérica do braço longo do cromossoma X (banda Xq28), compreende 13 exões (que codificam um total de 515 aminoácidos) e 12 intrões, distribuídos por cerca de 20Kb de DNA genômico (Figura V.4.) pelo que, em caso de deficiência a morbidade incide fundamentalmente em indivíduos do sexo masculino (hemizigotia) (Yoshida, 1989; Vulliamy *et al.*, 1997; May *et al.*, 2000; Cappellini & Fiorelli, 2008; Glader *et al.*, 2010). A clonagem e a sequenciação do gene humano permitiram a identificação de mais de 140 mutações que resultam na deficiência da enzima. Estas são sobretudo mutações pontuais não havendo referência da existência de extensas mutações deletérias no gene (*Gd*) da G6PD ou de mutações que provoquem alteração na matriz de leitura (*frameshift mutations*) (Vulliamy *et al.*, 1997), sugerindo que a ausência completa de G6PD pode ser letal (Beutler, 1994; Beutler *et al.*, 1996). Segundo a hipótese de Lyon (*in* Glader *et al.*, 2010), apesar das mulheres apresentarem dois cromossomas X por célula, homens e mulheres normais têm a mesma actividade enzimática nos seus glóbulos vermelhos, porque um dos cromossomas X em cada célula do embrião feminino é inactivada e permanece inactivo ao longo das subseqüentes divisões da

célula (Glader *et al.*, 2010). Sendo uma doença hereditária e estando o gene (*Gd*) localizado no cromossoma X, a expressão fenotípica da deficiência em G6PD tem um padrão típico da herança de caracteres ligado ao sexo e expressa-se com maior incidência nos homens (hemizigóticos), enquanto as mulheres heterozigóticas são clinicamente normais. Assim, são identificados nove genótipos dos quais cinco: GdB, GdA, GdB/GdB, GdB/GdA e GdA/GdA codificam variantes com actividade enzimática normal, agrupados como G6PD<sup>+</sup>; dois GdA<sup>-</sup> e GdA<sup>-</sup>/GdA<sup>-</sup> que codificam uma actividade enzimática deficiente e agrupados como G6PD<sup>-</sup> e por um último dois (mulheres heterozigóticas) GdB/GdA<sup>-</sup> e GdA/GdA<sup>-</sup> que codificam variantes com uma presumível actividade enzimática intermédia, agrupados como G6PD<sup>±</sup> (Yoshida, 1989; May *et al.*, 2000; Hedrick, 2011).

Figura V.4. Localização do gene *G6PD* no cromossoma X



Fonte: Retirado de Cappellini & Fiorelli (2008).

#### V.4. Variantes da G6PD

Em 1967, a OMS fez as primeiras recomendações para a caracterização da deficiência em G6PD. Uma revisão em 1989 permitiu agrupar em cinco classes as 400 variantes de G6PD, segundo *propriedades bioquímicas* (avaliação da actividade enzimática e mobilidade electroforética), *físico-químicas* (termo-estabilidade e comportamento cromatográfico) e *variáveis cinéticas* (concentração de substrato necessário para a reacção enzimática a metade da sua velocidade máxima). Segundo esta classificação, as variantes são diferenciadas de acordo com a magnitude da

deficiência da enzima e da severidade da hemólise. Segundo Luzzatto (2001) (*in* Cappellini & Fiorelli, 2008) as variantes podem ser classificadas como polimórficas ou esporádicas. As cinco classes da deficiência em G6PD, resultantes deste agrupamento, são as seguintes:

<b>CLASSE I</b>	<b>Variantes com deficiência severa, associada à anemia hemolítica crónica não-esferocítica.</b>
<b>CLASSE II</b>	Variantes com deficiência severa (1-10% da actividade enzimática residual), associada à anemia hemolítica aguda.
<b>CLASSE III</b>	<b>Variantes com deficiência moderada (10 - 60% da actividade enzimática residual)</b>
<b>CLASSE IV</b>	Variantes com actividade enzimática normal (60-150%)
<b>CLASSE V</b>	<b>Variantes com actividade enzimática aumentada (&gt;150%)</b>

A análise das variantes mostra que, na maioria dos casos, a deficiência em G6PD é devida à instabilidade da enzima, implicando a substituição, em locais diferentes, de aminoácidos que podem destabilizar a molécula (Cappellini & Fiorelli, 2008). A nível genético, devido ao elevado grau de variabilidade, foram descritas as seguintes variantes: *G6PD B* conhecida com variante normal ou do tipo-selvagem encontrada nos caucasianos, asiáticos e na maioria dos negróides, cuja actividade enzimática é normal e não está associada à hemólise (Classe IV); variante *G6PD A*, com actividade enzimática quase normal, também não associada à hemólise e mais duas variantes deficientes e muito frequentes: a variante Mediterrânea *G6PD Med* (563 C->T) e a variante *G6PD A<sup>-</sup>* (376 A->G), esta também conhecida no passado, como variante Africana. A *G6PD Med* é a variante deficiente mais comum, encontrada em caucasianos particularmente os da região do Mediterrâneo e também do Médio Oriente. A mobilidade electroforética da *G6PD Med* é idêntica à da *G6PD B*, contudo a actividade enzimática é muito reduzida (3%), sendo responsável pela anemia hemolítica severa (classe II), nos seus portadores (Glader *et al.*, 2010). Esta variante *G6PD Med* resulta de uma mutação no exão 6 da G6PD, onde se verifica uma transição<sup>2</sup> (Figura V.5) (Beutler *et al.*, 1996; Glader *et al.*,

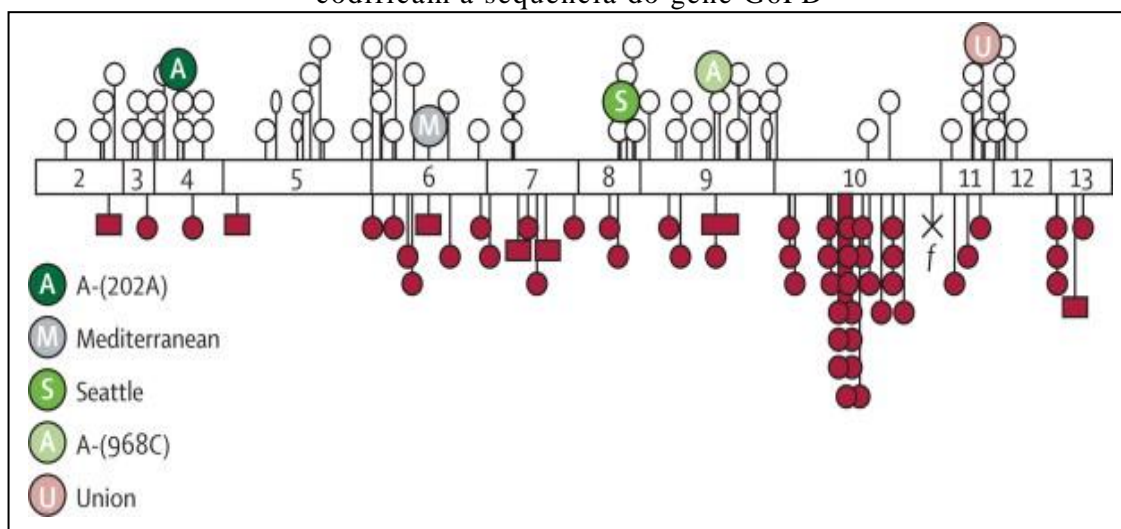
---

<sup>2</sup> Transição [i.e. mutação cuja substituição se faz de uma pirimidina por outra (timina por citosina T->C), ou de uma purina por outra (adenina->guanina)] de uma citosina para uma timina na posição 563 (563C>T), promovendo a troca dos aminoácidos serina por uma fenilalanina (Ser88Phe).

2010). Esta variante apresenta apenas 3% da actividade enzimática e uma prevalência, na população da região Mediterrânea, que varia entre os 2 e 20%.

Em relação à G6PD A<sup>-</sup> é a variante mais comum, associada à hemólise suave a moderada (Classe III), particularmente nos indivíduos afro-americanos. Tem elevada frequência em África, Norte e Sul da América, Índia Ocidental e países com descendência-afro, nomeadamente na Europa (Espanha, Itália e Portugal) (Cappellini & Fiorelli, 2008; Glader *et al.*, 2010).

Figura V.5. Esquema representativo das mutações mais comuns que codificam a sequência do gene G6PD



Legenda: As caixas enumeradas representam os exões. Os círculos abertos são as mutações que originam as variantes das classes II e III. Os círculos fechados representam as mutações esporádicas responsáveis pelas variantes severas (Classe I). As elipses abertas representam as mutações responsáveis pelas variantes da classe IV e os quadrados representam as pequenas deleções.

Fonte: Retirado de Cappellini & Fiorelli (2008)

Na África subsariana, o gene codificante da G6PD apresenta, essencialmente, um polimorfismo trialélico: G6PD (B) é o alelo mais comum, associado a actividade enzimática normal e frequência de 60 a 80% na população; G6PD (A) resulta de uma mutação pontual, substituição de uma adenina por uma guanina (A> G), na posição 376 do exão 5 do gene, que resulta na substituição de uma asparagina por aspartato (Asn126Asp), está associada a redução na eficiência da enzima para 80-90% e uma

frequência de 15-40%; e a variante G6PD (A<sup>-</sup>) definida pela ocorrência de duas mutações pontuais: (376A> G) descrita para a variante G6PD (A) e uma segunda que corresponde a substituição de uma guanina (G) por uma adenina (A) no nucleótico 202 (202G> A), situada no exão 4, a qual resulta na mudança do aminoácido codificado (Val68Met) Valina por uma Metionina, está associada a uma actividade enzimática de apenas 12% do normal, em indivíduos homo ou hemizigóticos. Este último alelo ocorre com uma frequência que varia entre os 5 – 25% nas populações subsarianas (May *et al.*, 2000; Enevold *et al.*, 2005; Cappellini & Fiorelli, 2008), sendo o único associado com a protecção à malária por *P. falciparum* nestas regiões. Apesar de a maioria dos indivíduos portadores do alelo G6PD (A<sup>-</sup>) serem normalmente assintomáticos, uma anemia hemolítica aguda pode ocorrer quer em mulheres hetero e homozigóticas, como nos homens hemizigóticos, sobretudo se os seus eritrócitos estiverem sujeitos a um maior stresse oxidativo (Ruwende & Hill 1998; Enevold *et al.*, 2005). Esta condição pode também ser induzida por agentes anti-inflamatórios ou quimioterapêuticos, incluindo os anti-maláricos tais como a sulfadoxina-pirimetamina, dapsona e primaquina. Este facto assume particular importância em áreas endémicas de malária particularmente na África subsariana, com o uso da primaquina, como terapia coadjuvante nas infecções por *P.vivax* e *P.ovale* (efeito hipnozoitocida). Portanto é crucial, nessas áreas, a avaliação prévia do *estado* em relação à G6PD, particularmente em indivíduos sob terapêutica anti-malárica (Enevold *et al.*, 2005).



## V.5. Fisiopatologia da Deficiência em G6PD e Manifestações Clínicas

Como referido na secção anterior, sabe-se que a descoberta desta enzimopatia eritrocitária, nos anos 50, fez-se no contexto da investigação das crises hemolíticas desencadeadas pelo uso de drogas com potencial oxidativo (primaquina) no tratamento da malária. Fisiopatologicamente, a desnaturação oxidativa da hemoglobina é o factor que mais influencia o processo hemolítico dos indivíduos com deficiência em G6PD. A enzima G6PD é necessária à conversão da glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato e consequentemente na produção de NADPH e de GSH. O GSH protege a hemoglobina contra a oxidação, resultante da destoxificação do peróxido de hidrogénio e da acção dos radicais livres. Em condições normais, os eritrócitos possuem actividade enzimática necessária para manter os níveis adequados de GSH. Em situações de deficiência em G6PD, os eritrócitos deixam de poder gerar quantidades suficientes de GSH para destoxificar o peróxido de hidrogénio (Glader *et al.*, 2010). A hemoglobina passa a ser oxidada, resultando na metahemoglobina (MetHb). Este processo de degradação da hemoglobina resulta na formação dos corpos de Heinz. O principal responsável pela redução endógena da MetHb, correspondendo a 99% da actividade redutora é a NADH metahemoglobina redutase (NADHMR), um sistema com duas enzimas, que são o citocromo B5 e citocromo B5-redutase (CB5R) (Nascimento *et al.*, 2008). Os corpos de Heinz ligam-se aos grupos sulfidril da membrana, tornando os eritrócitos mais rígidos e deformados. Estes, devido ao bloqueio na microcirculação, são fagocitados parcial ou integralmente pelos macrófagos, resultando em anemia hemolítica. A hipóxia tecidual provocada pela MetHb é consequência não só da diminuição da Hb livre para transportar  $O^2$  (anemia relativa), mas também da dificuldade de libertação de  $O^2$  para os tecidos (Nascimento *et al.*, 2008).

A expressão clínica das variantes de *G6PD* incluiu um amplo espectro de síndromes hemolíticas. A maioria dos indivíduos deficientes em G6PD são frequentemente assintomáticos, mas muitos têm episódios de anemia hemolítica aguda, enquanto outros têm anemia hemolítica crónica. Uma pequena percentagem de portadores de deficiência padece de um quadro clínico mais pronunciado: *anemia hemolítica não-esferocítica congénita*. O curso da doença varia desde episódios de hemólise induzidos por drogas, stresse oxidativo, infecções ou ingestão de favas

(*favismo*), até formas graves de anemia hemolítica. A deficiência em G6PD, contrariamente ao gene *HBB*, não altera a esperança de vida, nem a qualidade e/ou actividade dos indivíduos afectados (Cappellini & Fiorelli, 2008). Estão descritos episódios de hemólise em crianças e adultos, nas variantes mais prevalentes: (*G6PD A<sup>-</sup>* e *G6PD Med*), induzidos por exposição à drogas que têm um potencial redox muito alto (i.e. primaquina e certas sulfamidas), como também após infecções, distúrbios metabólicos ou ingestão de favas (Luzzatto, 2006; Cappellini & Fiorelli, 2008). Têm sido citados outros factores predisponentes de hemólise em indivíduos deficientes em G6PD tais como: enfarte do miocárdio, diabetes e exercício físico extenuante, porém o mecanismo pela qual o dano oxidativo conduz a hemólise continua a ser pouco claro (Cappellini & Fiorelli, 2008). Os quadros clínicos em situações de deficiência em G6PD são bastante variáveis, dependentes do grau de stresse oxidativo, da origem geográfica e/ou raciais e da variante genética, assim destacam-se os seguintes:

- *Anemia hemolítica induzida por drogas*
- *Anemia hemolítica induzida por infecções*
- *Favismo*
- *Icterícia neonatal*
- *Anemia hemolítica congénita não esferocítica*
- *Regeneradores genéticos do fenótipo de G6PD*

Na maioria dos casos, a *anemia* ocorre somente após episódios hemolíticos desencadeados pelo stresse oxidativo. A hemólise aguda é caracterizada clinicamente por fadiga, dor lombar, anemia e icterícia (Luzzatto, 2006). Laboratorialmente traduz-se por um aumento dos marcadores de hemólise: bilirrubina não conjugada, desidrogenase láctica e reticulócitos. A anemia é do tipo normocítica e normocrómica, com reticulocitose evidente quatro a cinco dias após o início do episódio hemolítico (Luzzatto, 2006; Cappellini & Fiorelli, 2008; Glader *et al.*, 2010). Logo após o episódio hemolítico, a hemoglobina desce rapidamente para 3 a 4 g/dl, verificam-se alterações morfológicas ao nível dos eritrócitos traduzidas pela presença de anisocitose, poiquilocitose, policromasia, células dentadas e alguns esferócitos. Em situações de suspeita clínica de deficiência em G6PD, deve-se recorrer aos testes laboratoriais de rastreio como: pesquisa de corpos de Heinz, dosagem da metahemoglobina e teste da

redução de metahemoglobina. O teste específico é a avaliação da actividade enzimática da G6PD (Luzzatto, 2006; Cappellini & Fiorelli, 2008).

#### **a) Anemia hemolítica induzida por drogas**

Para além da primaquina, várias outras drogas têm sido associadas à hemólise aguda em indivíduos deficientes em G6PD, apesar de o efeito directo entre a droga específica e a hemólise ser na maioria dos casos difícil de se estabelecer. Na Tabela V.1., resumimos as drogas e outros agentes químicos associados à hemólise em pacientes com deficiência em G6PD (Beutler, 1994; Cappellini & Fiorelli, 2008).

Tabela V.1. Drogas e outros químicos associados à hemólise aguda em pacientes com deficiência em G6PD

Quimioterápicos	Associação Esclarecida	Provável Associação	Associação Duvidosa
<b>Antimaláricos</b>	Primaquina Pamaquina	Cloroquina	Mepacrina Quinina
<b>Sulfonamidas</b>	Sulfanilamida Sulfacetamida Sulfapiridina Sulfametoxazole	Sulfadimidina Sulfasalazina	Aldesulfona Sulfadiazina Sulfafurazole
<b>Sulfonas</b>	Dapsona		.
<b>Sulfonilureias</b>		Glibenclamida	
<b>Nitrofurantoina</b>	Nitrofurantoina		
<b>Antipiréticos ou Analgésicos</b>	Acetanilide	Aspirina	Paracetamol e Fenacetina
<b>Outras Drogas</b>	Acido Nalidixico Niridazol Methyltium Fenazopiridina Co-trimoxazole	Ciprofloxacina Chloranfenicol Análogos Vit. K Ácido ascórbico Mesalazina	Ácido aminosalicílico Doxorubicina Probenecide Dimercaprol
<b>Outros Químicos</b>	Naftaleno 2,4,6-trinitrotolueno	Extrato de Acalyfa	

Fonte: Retirado e adaptado de Cappellini & Fiorelli (2008).

#### **b) Anemia hemolítica induzida por infecções**

Entre outras causas prováveis de hemólise em indivíduos com deficiência em G6PD têm sido indicadas as seguintes infecções: A hepatite viral A e B, citomegalovírus, pneumonia e a febre tifóide. Nessas situações a gravidade da hemólise

pode ser precipitada quer pela administração concomitante de medicamentos, quer pela função hepática e idade. Em hemólises muito severas o recurso rápido à hemotransfusão pode alterar a evolução clínica, com melhoria do quadro. A insuficiência renal aguda é a complicação potencialmente mais séria, descrita nos casos de hepatite viral associada à deficiência em G6PD, particularmente em adultos, sendo contudo rara em crianças (Luzzatto, 2006; Cappellini & Fiorelli, 2008).

### **c) Favismo**

O favismo é uma doença caracterizada pelo aumento de susceptibilidade à anemia hemolítica após a ingestão de favas, originalmente observada em indivíduos portadores de variantes com deficiência severa em G6PD e actividade enzimática residual inferior a 5%, da região do Mediterrâneo (Galiano *et al.*, 1990, Beutler, 1994; Cappellini & Fiorelli, 2008). Apesar de as sequelas clínicas do *favismo* terem sido reportadas no início do século XX, a associação entre a ingestão de favas e o distúrbio clínico (hemólise e hemoglobínúria) remonta a muitos séculos sobretudo não só nos países do Mediterrâneo, onde foi apontado ser amplamente presente, como também no Médio e Extremo Oriente e no norte de África, onde o crescimento e o consumo de favas foi amplamente difundido (Galiano *et al.*, 1990). Acredita-se que o favismo está mais frequentemente associado à deficiência em *G6PD Med* (Cappellini & Fiorelli, 2008). Contudo nem todos os indivíduos deficientes em G6PD desencadeiam favismo após a ingestão de favas, sendo comum uma resposta imprevisível até num mesmo indivíduo, sugerindo-se desse modo que vários outros factores podem afectar o desenvolvimento da doença, incluindo o estado de saúde prévio do paciente e a quantidade de favas ingeridas (Cappellini & Fiorelli, 2008).

A anemia hemolítica no favismo geralmente ocorre após 24 horas da ingestão de favas. A hemoglobínúria é muito mais grave do que a observada nas crises hemolíticas desencadeadas por drogas ou pela infecção, apesar de as concentrações de bilirrubina serem mais baixas (Cappellini & Fiorelli, 2008). A anemia é geralmente aguda e grave, pode exigir uma transfusão de sangue e em alguns pacientes pode evoluir para a insuficiência renal aguda devida quer à isquemia quer à precipitação da hemoglobina.

#### **d) Icterícia Neonatal**

Vários estudos sugerem que, aproximadamente, um terço de todos os recém-nascidos do sexo masculino, com icterícia neonatal, têm deficiência em G6PD. Porém, nos recém-nascidos do sexo feminino, com icterícia, a deficiência é menos comum. (Cappellini & Fiorelli, 2008). A icterícia neonatal, geralmente, manifesta-se por volta do primeiro ao quarto dia, após o nascimento; semelhante à icterícia fisiológica, é tipicamente mais grave em prematuros com deficiência em G6PD do que em bebés nascidos dentro do período normal de gestação. A severidade da icterícia neonatal nas diferentes populações com deficiência em *G6PD* é muito variável, sendo recentemente apontados quer factores genéticos, culturais, como ambientais (i.e. exposição materna a drogas oxidantes, tratamentos à base de ervas, utilização de bolas de naftaleno-cânfora nas roupas dos bebés), na contribuição das diferenças encontradas. O mecanismo pelo qual a deficiência em G6PD causa icterícia neonatal ainda não está totalmente esclarecido (Cappellini & Fiorelli, 2008).

### **V.6. G6PD e Protecção contra a Malária**

De acordo com uma estimativa conservadora (Cappellini & Fiorelli, 2008), existem 400 milhões de pessoas que são portadoras de pelo menos uma mutação no gene responsável pela deficiência em G6PD, estando os alelos deficientes distribuídos mundialmente, como se pode observar no mapa (figura V.1). Tal como nos referimos na secção anterior, a maior prevalência é relatada na África, Sul da Europa, Médio Oriente, Sudeste Asiático e nas ilhas Centrais e do Sul do Pacífico actualmente também bastante prevalente na América do Norte e do Sul e em partes do norte da Europa, resultante da emigração recente (Cappellini & Fiorelli, 2008). Nas últimas décadas tem sido utilizada a análise molecular para mapear a prevalência da deficiência em G6PD. Sabe-se que a distribuição mundial da malária é notavelmente semelhante à dos alelos mutados de G6PD. Esta co-distribuição parece ser justificada pela hipótese (de modo geral bem aceite) de a deficiência em G6PD conferir uma protecção parcial contra a malária apesar de se desconhecer (e ser ainda uma questão muita controversa), o grau de protecção

conferido e que indivíduos (mulheres heterozigóticas e/ou homens hemizigóticos) gozam dessa protecção. Estudos recentes, em humanos sobre a diversidade haplotípica e de desequilíbrio linkage no *loci G6PD*, evidenciaram a origem recente de alelos que conferem resistência à malária (Tishkoff *et al.*, 2001; Weatherall *et al.*, 2002). A análise de dois haplótipos G6PD demonstrou que as duas variantes comuns (*G6PDA<sup>-</sup>* e *G6PDMed*) parecem ter evoluído de modo independente entre 3.000 e 11.000 anos atrás, sugerindo que a idade de cada variante se situaria entre 3.800 – 11.760 anos para *G6PDA<sup>-</sup>* e 3.330 - 6.640 para a *G6PDMed*) (Tishkoff *et al.*, 2001; Weatherall *et al.*, 2002). Estas datas são consistentes e reforçam as pesquisas que apontam que a selecção teria ocorrido em África há mais de 10.000 anos, na era do desenvolvimento da agricultura (5.000 - 10.000 anos atrás) e proporcionou condições necessárias à propagação efectiva da malária (Weatherall *et al.*, 2002). A correlação geográfica entre a distribuição das variantes polimórficas de deficiência em G6PD e áreas com história de endemicidade de malária por *P. falciparum* sugere que esta desordem genética aumentou em frequência devido ao processo de selecção natural (Ruwende & Hill, 1998), não obstante os mecanismos de protecção relativa contra a malária, ainda permanecerem pouco claros. Ruwende *et al.* (1995) observaram que o alelo G6PD A<sup>-</sup> (o mais prevalente em África) estava associado à redução do risco de malária grave por *P. falciparum*, tanto em mulheres heterozigóticas como em homens hemizigóticos (46% e 58%, respectivamente) (Ruwende *et al.*, 1995). Evidências de protecção contra a malária também têm sido observadas em estudos *in vitro*, comparando o crescimento de *P. falciparum* em células deficientes para a variante *G6PDMed* e variante *G6PDA<sup>-</sup>*, com células normais provenientes de indivíduos saudáveis. Estes estudos mostraram que o crescimento do parasita é mais lento nas células deficientes em G6PD do que nas células normais (Luzzatto *et al.*, 1980, 1983 *in* Cappellini & Fiorelli, 2008). Estas observações revelaram que devido aos danos oxidativos provocados pelo parasita, a esquizogonia intracelular nas células deficientes seria mais afectada que a invasão (Miller, 1994; Cappellini & Fiorelli, 2008). Um estudo realizado por Luzzatto (1969) utilizando eritrócitos com actividade enzimática normal para G6PD de mulheres heterozigóticas (que se submeteram a inactivação aleatória do cromossoma X), mostrou que o crescimento do parasita era duas a oitenta vezes (2-80) maior do que nos eritrócitos deficientes (Luzzatto, 2006). Como vários alelos polimórficos são

encontrados na maioria das áreas de alta prevalência de deficiência em G6PD, sugere-se que o efeito benéfico destas mutações pode resultar da redução do crescimento parasitário no interior dos eritrócitos, por induzir uma fagocitose mais eficiente das células parasitadas ou porque as células deficientes em G6PD são mais frágeis ao dano oxidativo induzido pelo parasita do que as células normais (Yuthavong *et al.*, 1990; Ruwende & Hill, 1998).

## VI. COMPOSIÇÃO DA(S) POPULAÇÃO(ÕES) PARASITÁRIA(S)

### VI.1. Introdução Histórica

Desde os tempos remotos que o tema sobre a co-ocorrência de mais de uma espécie de *Plasmodium* no hospedeiro humano (infecções mistas)<sup>3</sup> tem sido muito controverso (Snounou, 2004; Snounou & White, 2004). Apontam-se em parte os debates sobre a existência ou não de diferentes espécies de *Plasmodium* humanos e nos anos vinte do século passado sobre a eficácia da malarioterapia. O conhecimento científico da dinâmica de infecção por *Plasmodium sp.* em humanos baseou-se essencialmente em trabalhos iniciados há mais de 40 anos (Molineaux, 1988; McKenzie *et al.*, 2002), com malária induzida para tratar a neurosífilis. Foi com a malarioterapia que se viabilizou o conhecimento da doutrina da especificidade das espécies e da diversidade parasitária na imunidade da malária, inferidos a partir de respostas clínicas e parasitológicas, resultantes de inoculações sequenciais (McKenzie *et al.*, 2002). Em 1890, Alphonse Laveran defendia a ideia de que todos os parasitas pertenciam a uma única espécie, apesar das diferenças morfológicas: a chamada “*teoria da unicidade*”; não obstante, na época, o malariologista italiano ter classificado os parasitas da malária em três espécies. O estudo dos vários fenómenos associados à co-ocorrência das espécies plasmodiais remonta há mais de um século (McKenzie & Bossert, 1997). Quando, em 1895, Thayer & Hewetson identificaram a existência de mais de uma espécie, foi na época objecto de debate; outro exemplo está relacionado com as múltiplas discussões sobre as irregularidades biogeográficas relatadas na época: a ausência (actualmente negada) de *P. vivax* e presença de *P. ovale* na África Ocidental, distribuição mundial e irregular de *P. malariae* (Molineaux, 1988), bem como a frequência da co-ocorrência de espécies no mesmo indivíduo, já naquela altura referida

---

<sup>3</sup> Infecção mista – Quando a infecção é causada por mais de uma espécie de *Plasmodium*



como provável *infecção mista* (McKenzie & Bossert, 1997, 1997a, 1997b). Uma ampla pesquisa sobre a prevalência de espécies plasmodiais em humanos, efectuada por Knowles & White (1930) (*in* McKenzie & Bossert, 1997), demonstrou que a frequência da combinação das diferentes espécies na infecção em seis continentes habitados tinha frequentemente um carácter sazonal e que as baixas prevalências de co-infecções relatadas eram atribuídas a uma falha humana (dos microscopistas) (McKenzie & Bossert, 1997). Cohen (1974), numa análise da literatura sobre a epidemiologia da malária, considerou que as reduzidas prevalências referidas não eram totalmente atribuídas a artefactos da microscopia, mas muitas vezes a fenómenos estatisticamente significativos, na base da insuspeita biológica da “imunidade heteróloga” (Cohen *et al.*, 1974). Esta sua hipótese foi mais tarde alargada englobando também os padrões sazonais da transmissão, defendidos antes por Knowles & White (1930) e utilizados durante o projecto Garki (*in* Molineaux & Gramiccia, 1980; Molineaux *et al.*, 1980), que permitiram a demonstração de uma excessiva prevalência de infecções mistas (Molineaux, 1988; McKenzie & Bossert, 1997). Para Richie (1988), a coexistência das espécies só foi possível devido à divergência antigénica e portanto escaparia à imunidade heteróloga, sugerindo que a supressão interespecífica competitiva em infecções simultâneas poderia ser equilibrada por algumas formas de facilitação da sucessão recíproca (Richie, 1988).

## VI.2. Diversidade das Espécies

Nas últimas décadas, a investigação da diversidade parasitária em termos de espécies ou dentro de populações de espécies (polimorfismo genético) tem vindo a ganhar mais importância (McKenzie & Bossert, 1997; Mayxay *et al.*, 2004; Snounou & White, 2004; Marques *et al.*, 2005; Bruce *et al.*, 2008). Vários estudos demonstraram que na maior parte do mundo onde a malária é endémica é comum a co-ocorrência de mais de uma espécie ou de diferentes genótipos de uma mesma espécie, tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado (Richie, 1988; Snounou *et al.*, 1993; Arez *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 2008; Sutherland *et al.*, 2010). Estudos experimentais em humanos e roedores revelaram que quando as diferentes espécies de parasitas infectam

o mesmo hospedeiro parecem interagir entre si, afectando os parâmetros relacionados com a mortalidade, a patogenia e a dinâmica da infecção (no sentido de supressão ou aperfeiçoamento da espécie).

Sabe-se que entre as espécies *P. falciparum* é o responsável pela maior parte da mortalidade atribuído directamente à malária, seguido de *P. vivax*, que apesar de sua reduzida frequência na África Subsariana (White, 2003; Miller *et al.*, 1976) é responsável por elevada morbilidade a nível mundial.

As co-infecções nos seres humanos são resultantes da picada sequencial de um mosquito isoladamente infectado ou de uma única picada de um mosquito duplamente e/ou triplamente infectado (McKenzie & Bossert, 1997) ou ainda da possível activação simultânea dos estádios latentes do parasita no fígado, por exemplo de *P. vivax* (McQueen & McKenzie, 2006). Estudos transversais, para avaliar a prevalência de espécies, segundo relatos de Richie (1988), demonstraram que muitas vezes são identificadas menos infecções mistas do que o esperado, sugerindo que este fenómeno possa ser resultante da exclusão de um parasita pelo outro ou da supressão da sua parasitemia para níveis indetectáveis (Richie, 1988). Segundo estas teorias, as prevalências podem variar reciprocamente entre as estações ou seja, enquanto uma espécie aumenta a prevalência a outra diminui, apesar de um aumento paralelo das taxas de transmissão de ambos (i.e. teoria da supressão de uma espécie por outra) (Richie, 1988). A hipótese de supressão é apoiada por evidências provenientes da inoculação simultânea de duas espécies de *Plasmodium sp.* em modelo experimental. Muitos estudos têm demonstrado que uma ou ambas as espécies são suprimidas, propondo que este mecanismo de supressão pode ser mediado pela competição das células do hospedeiro ou pelos nutrientes ou ainda pela imunidade heteróloga (Cohen *et al.*, 1974). Neste caso as espécies suprimidas reemergem após outras espécies terem diminuído, demonstrando uma infecção prolongada. Outros estudos longitudinais em hospedeiros individuais indicam que o parasita da malária pode também influenciar favoravelmente o meio ambiente de um ou do outro hospedeiro, provavelmente devido ao seu efeito depressivo sobre o sistema imunológico: isto é demonstrado, pela recrudescência de uma espécie de malária latente, imediatamente antes ou após a onda parasitária da outra espécie (Richie, 1988).

Segundo Richie (1988), são mínimas as evidências experimentais sobre a possibilidade de uma espécie poder facilitar a recrudescência de outra, o que pode reflectir a escassez de investigações sobre esse fenómeno. Estudos laboratoriais mostram apenas uma resistência cruzada *minor* entre as espécies compartilhando o mesmo hospedeiro, sendo esta observação consistente com a hipótese de que a co-ocorrência tem levado à divergência antigénica ou então que as espécies apresentando forte resistência heteróloga não podem coexistir na mesma população hospedeira (Cohen *et al.*, 1974; Richie, 1988). Esta complementaridade ocorre não só com a resposta imune do hospedeiro mas também com muitas outras características da história evolucionária do parasita, por exemplo, a electividade e a partilha pelas células do hospedeiro (Richie, 1988).

### VI.3. Interacção das Espécies

Segundo Zimmerman (2004), a falta de evidência de uma relação evolutiva consistente entre as espécies parasitárias da malária levou-o a concluir que existem diferenças geográficas no modo como as espécies de malária humana interagem e que essas interacções podem até mesmo mudar de ano para ano em um dado local. Corrobora que a teoria da supressão ou exclusão pode ocorrer entre parasitas da malária, porém comenta que as prevalências resultantes desse efeito poderão ser falseadas por factores relacionados com a heterogeneidade da susceptibilidade do hospedeiro (Zimmerman *et al.*, 2004). Teorias recentes defendem que as interacções entre as espécies de *Plasmodium* que infectam os humanos podem influenciar os esforços no desenvolvimento de futuras estratégias de sucesso no controlo ecológico da malária nas diversas configurações endémicas. Recomendam a revisão do tipo de instrumentos utilizados na caracterização das infecções maláricas, bem como, na interpretação dos dados gerados por esses instrumentos e de alguns aspectos práticos defrontados nos esforços de controlo da malária. Zimmerman (2004) defende que a identificação das lacunas existentes nas tecnologias de diagnóstico e no conhecimento das características da dinâmica da infecção malárica vai permitir avaliar como as limitações actuais podem influenciar a nossa compreensão sobre as infecções de espécies mistas de *Plasmodium*

*sp.* em seres humanos. Propõe uma listagem de quatro lacunas subjacentes ao conhecimento sobre as infecções mistas, que mencionamos resumidamente:

- Lacuna 1: O diagnóstico da infecção (*particularmente o baixo nível de infecção*) continua a ser um desafio cada vez maior (WHO, 1999a). Quais os melhores métodos de diagnóstico para realizar estudos desta natureza? Quais as técnicas de laboratório úteis na avaliação quantitativa e específica da espécie?
- Lacuna 2: A variação dinâmica da espécie de *Plasmodium* é observada tanto em indivíduos infectados como em comunidades endémicas de malária. Quais os factores que contribuem para essa variação? Existe algo desencadeado pela espécie de *Plasmodium* que influencia a infecção por uma segunda, terceira ou quarta espécie? Como é que o fluxo dinâmico da parasitémia em infecções mistas num indivíduo infectado se traduz em padrões de infecção numa população de área endémica? Existe alguma espécie dominante que poderia ser substituída por espécies menos dominantes?
- Lacuna 3: As proteínas de superfície do merozoíto que participam na invasão dos eritrócitos são funcionalmente semelhantes. Que fazer da homogeneidade antigénica existente entre as proteínas de superfície do parasita da malária em humanos? Quais são as implicações de homogeneidade antigénica no desenvolvimento de vacinas que envolvam mais do que uma espécie de *Plasmodium*? Quais são as implicações da homogeneidade antigénica nas interações de espécies mistas de *Plasmodium*?
- Lacuna 4: As interações entre as diferentes espécies de *Plasmodium* têm sido sugeridas como um factor que influencia a doença. Se as interações entre as espécies reduzirem a gravidade da doença, os programas de desenvolvimento de vacinas ou drogas que visem uma espécie podem aumentar o risco de doença grave nas populações de áreas endémicas?

#### VI.4. DIAGNÓSTICO DE INFECÇÕES MISTAS

A frequência aparente das infecções mistas está dependente dos métodos usados para a detecção dos parasitas. Estudos epidemiológicos demonstraram que as infecções mistas são mais comuns do que as detectadas por microscopia óptica (MO), sendo mais

frequentemente identificadas por métodos mais sensíveis como PCR (detecta o DNA específico da espécie) (Ohrt *et al.*, 2002; Zakeri *et al.*, 2002). Estudos recentes confirmam que as infecções mistas são muito mais comuns do que geralmente reconhecido, apesar de a maioria dos estudos transversais na população humana demonstrarem défices de infecções mistas em relação às frequências esperadas com base nas frequências independentes das espécies (Zakeri *et al.*, 2002; Mayxay *et al.*, 2004). Estudos realizados na Tailândia demonstraram que aproximadamente 30 a 50% de todas as infecções maláricas registadas são mistas (*P. vivax*+*P. falciparum*) (Snounou, 2004; Snounou & White, 2004; Zimmerman *et al.*, 2004). Contudo, estudos baseados em técnicas de biologia molecular e em análises estatístico-matemáticas sugerem que esses défices podem ser uma consequência da dinâmica da infecção: por exemplo, o pico da parasitémia na infecção mista (*P. vivax*-*P. falciparum*) normalmente alterna entre as espécies (McQueen & McKenzie, 2006) e os défices aparentes a nível da população podem reflectir os limiares de detecção da microscopia e as interacções biológicas entre os parasitas, em indivíduos infectados (McQueen & McKenzie, 2006). Pensa-se, actualmente, que a dinâmica da infecção mista (por exemplo *P. vivax*+*P. falciparum*) apresenta sérios desafios às intervenções quer a nível individual como a nível da população: os erros de diagnóstico e as drogas correspondentes ao tratamento podem permitir que as espécies crípticas desenvolvam um efeito *rebound* com graves consequências clínicas (McQueen & McKenzie, 2006).

Utilizando a técnica padrão de diagnóstico – microscopia óptica – as infecções mistas são muitas vezes difíceis de detectar, pois todas as infecções passam por períodos de baixas parasitémias. A alternância entre períodos de parasitémia patente (i.e. quando é possível observar facilmente parasitas no sangue periférico) e períodos de parasitémia latente (i.e. quando não é possível observar parasitas no sangue periférico), e o facto de, por vezes ser difícil distinguir os parasitas apenas pelas suas características morfológicas, mesmo com altas parasitémias contribuem para que haja discrepâncias entre a parasitémia real e a parasitémia observada, quando determinada pela microscopia óptica (Richie, 1988; Zakeri *et al.*, 2002; Snounou & White, 2004; Zimmerman *et al.*, 2004). Estudos sobre a epidemiologia da malária têm tradicionalmente usado a MO para avaliar quer a prevalência da infecção na população humana quer a densidade parasitária. Este método parasitológico directo (Gota espessa

+ Esfregaço) permite a diferenciação entre as espécies mas não diferencia os subtipos de uma mesma espécie. Em regiões hipo e mesoendémicas as reduzidas parasitémias (menos de cinco glóbulos vermelhos infectados/ $\mu$ l), tornam difícil a identificação de espécies. Outros factores (para além dos descritos na secção sobre o diagnóstico da malária), que podem influenciar a precisão do diagnóstico parasitológico directo são: a qualidade da preparação das lâminas de sangue, o número de campos microscópicos analisados (volume de sangue) e a competência do microscopista (Zimmerman *et al.*, 2004). Na prática a microscopia convencional, por se tratar de uma técnica menos sensível e depender sobretudo da experiência do técnico, permite em regra a detecção de 1 a 2% das infecções mistas (Mayxay *et al.*, 2004; Zaman *et al.*, 2001).

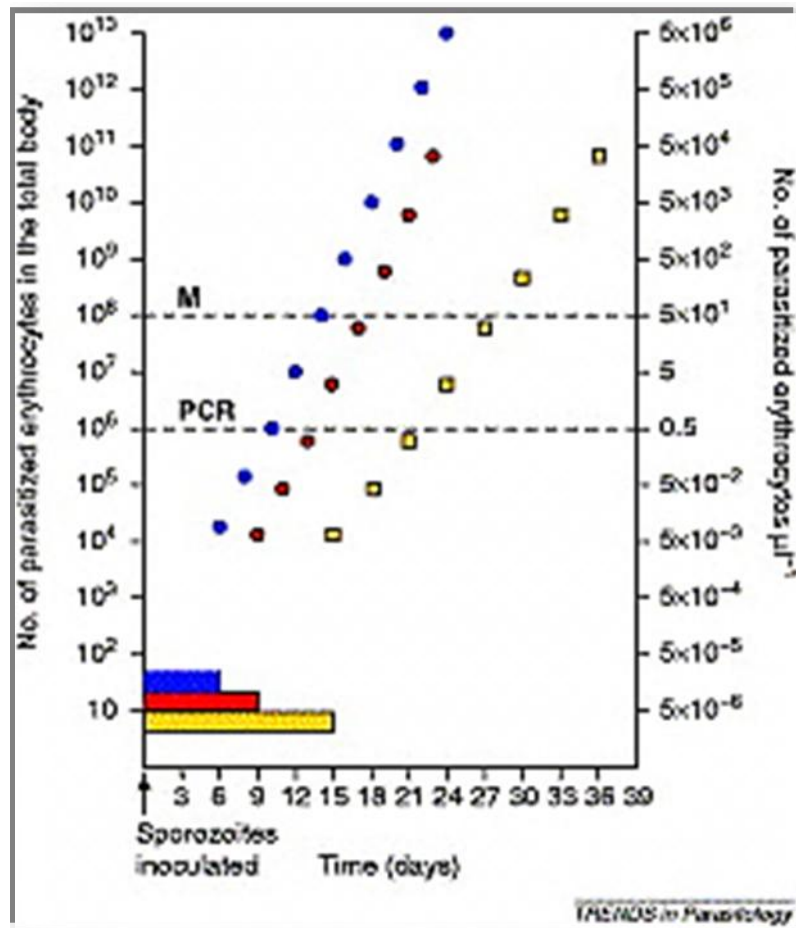
A metodologia baseada na PCR introduziu novas estratégias para o diagnóstico da infecção por *Plasmodium* e alterou significativamente a perspectiva sobre a epidemiologia da malária. A técnica de PCR permite, quando aplicada a grandes amostras, a identificação dos polimorfismos das espécies e a detecção de populações parasitárias mistas, sobretudo quando existentes em densidades muito baixas (Snounou *et al.*, 1993; Zaman *et al.*, 2001; Greenwood, 2002). O processamento de grandes amostras introduz elementos que aperfeiçoam a uniformidade de análise a favor da melhoria da precisão e reprodutibilidade do diagnóstico de espécies (Zimmerman *et al.*, 2004). As técnicas baseadas em PCR são bastante sensíveis e específicas e permitem o reconhecimento de parasitémias muito reduzidas (Snounou *et al.*, 1993; Zaman *et al.*, 2001; Greenwood, 2002), isto contrasta com uma boa microscopia que detecta por volta de 10-50 parasitas por microlitro/sangue (Greenwood, 2002).

## VI.5. Dinâmica da Infecção

Tal como referido na introdução deste capítulo, foi com a malarioterapia que se viabilizou o conhecimento científico da dinâmica de infecção por *Plasmodium sp.* em humanos e da doutrina da especificidade das espécies. Zimmerman (2004), na revisão sobre a dinâmica da infecção mista, considera crucial, na interpretação das infecções por diferentes espécies de *Plasmodium*, as características biológicas básicas de cada espécie e propõe um modelo explicativo: (Figura VI.1) (Zimmerman *et al.*, 2004). Por exemplo,

a duração mínima da fase hepática de infecção *P. falciparum* é de seis dias (Garnham, 1966), sendo de oito a nove dias para *P. vivax* e *P. ovale* (Garnham, 1966) e 15 dias para *P. malariae*.

Figura VI.1. Características da parasitemia nas fases pré-eritrocítica e eritrocítica das diferentes espécies de malária em humanos



Legenda: A figura mostra como um único esporozoítos de espécies diferentes de malária foi usado para infectar seres humanos, conforme indicado: *P. falciparum* (barra azul e círculo), *P. vivax* (barra vermelha e círculo); *P. ovale* assemelha-se a *P. vivax* e *P. malariae* (barra amarelo e quadrado). A duração mínima do estágio de infecção no fígado está representada em azul (*P. falciparum*), vermelho (*P. vivax* e *P. ovale*) e amarelo (*P. malariae*). Chave: M [quando a parasitemia da infecção malárica foi observada por análise de esfregaço de sangue convencional ( $2 \times 10^8$  número total de parasitas no organismo)]; PCR – quando a parasitemia da infecção malárica foi identificada por diagnóstico baseado em PCR ( $1$  eritrócito infectado por  $5 \times 10^6$  eritrócitos  $\mu\text{l}^{-1}$ ).

Fonte: Retirado e adaptado de Zimmerman *et al.* (2004).

Curiosamente, apesar de não ser reconhecida a produção de hipnozoítos por *P. malariae*, estão descritos casos de recrudescência da infecção por esta espécie, anos seguintes após a negatividade do exame de esfregaço sanguíneo (Garnham, 1966; Zimmerman *et al.*, 2004). Outro aspecto a ser considerado na dinâmica da infecção é o número estimado de merozoítos produzidos por um hepatócito infectado e que varia em função de cada espécie, assim: estima-se para *P. falciparum* 30.000; 10.000 para *P. vivax* e 15.000 para *P. malariae* e *P. ovale* (Garnham, 1966; Zimmerman *et al.*, 2004). A electividade das espécies de *Plasmodium* pelas distintas populações eritrocitárias é outra das características básicas da dinâmica da infecção: enquanto *P. falciparum* mostra uma preferência por eritrócitos mais jovens, sendo capaz de infectar eritrócitos de todas as idades, *P. vivax* e *P. ovale* são observados a preferir infectar os reticulócitos e *P. malariae* é sugerido infectar preferencialmente eritrócitos maduros. A densidade pirogénica<sup>4</sup> [pyrogenic density - (PD)] (White, 2003; Zimmerman *et al.*, 2004) varia consideravelmente de espécie para espécie: *P. vivax* e *P. ovale* são capazes de induzir febre com uma parasitémia à volta dos 100 IRBC $\mu\text{l}^{-1}$  (glóbulos vermelhos infectados por  $\mu\text{l}$ ) em adultos não-imunes; em contraste, *P. falciparum* induz febre com parasitémias mais elevadas, acima de 10<sup>4</sup> IRBC $\mu\text{l}^{-1}$  (White, 2003). Estima-se que a parasitémia da infecção por *P. falciparum* possa atingir níveis aproximadamente 100 vezes maiores do que outra das três espécies do parasita da malária humana estudadas, sendo capaz de exceder os 10<sup>5</sup> IRBC $\mu\text{l}^{-1}$ . No entanto, considera-se que estes valores observados podem variar nas diferentes configurações endémicas, quer em função do nível de exposição à malária como da faixa etária (PD diminui com a idade) (Rogier *et al.*, 1996). Apesar de a febre estar fortemente associada à parasitémia sobretudo em indivíduos não imunes e ser a resposta imune do hospedeiro um mecanismo regulador, quer da subida, quer da descida da parasitémia, em indivíduos semi-imunes infectados, a associação entre a febre e as alterações na parasitémia não parece ser tão robusta quanto se pensava (Bruce & Day, 2002).

---

<sup>4</sup> Densidade pirogénica – Quando a densidade parasitária é capaz de provocar febre (>37,3°C)



## VI.6. Resposta Imunológica – Reacção-Cruzada

Apesar de os primeiros estudos de investigação sobre as interacções entre as espécies de *Plasmodium* terem sugerido uma possível similaridade antigénica entre as diferentes espécies que permitiria ao indivíduo após uma vacina derivada da molécula de uma determinada espécie, adquirir protecção contra outros parasitas da malária humana (Cohen *et al.*, 1974), dados para apoiar essa hipótese não têm sido produzidos. Estudos recentes apontam que pouca ou nenhuma imunidade cruzada entre espécies foi observada durante ensaios da terapia da febre da malária e que os indivíduos expostos a uma espécie de *Plasmodium* não exibem protecção contra as altas parasitémias ou malária clínica, resultantes da infecção por diferentes espécies de *Plasmodium* (Jeffery, 1966). Outros estudos sugerem que a infecção primária por *P. malariae* estava associada à menor parasitémia e doença na malária secundária à infecção por *P. falciparum*. Segundo Zimmerman (2004), existem algumas razões que têm contribuído para que a natureza ilusória da imunidade cruzada inter-espécies se tenha tornado aparente, como por exemplo, a baixa similaridade na sequência de aminoácidos não promover o reconhecimento imunológico das inter-espécies de *Plasmodium*, apesar da função antigénica semelhante, da expressão e da localização. Mais especificamente, os estudos de caracterização das proteínas circum-esporozoítas (CSPs) dos parasitas da malária humana têm relatado muitas diferenças entre a sequência de aminoácidos de *P. falciparum* (primário repetindo o aminoácido NANP), *P. vivax* (GDRADGQPA [VK210], ANGAGNQPG [VK247]) (Rosenberg *et al.*, 1989) e *P. malariae* (NAAG).

## VI.7. Efeitos Sobre a Patologia

As infecções mistas são muitas vezes subestimadas e poucos estudos têm focado o tema. Existem algumas evidências de que eventuais interacções entre as diferentes espécies presentes simultaneamente no mesmo hospedeiro possam afectar a gravidade da doença. Estudos realizados em áreas endémicas mostraram que os efeitos sobre a patologia parecem ocorrer, tais como, a atenuação da gravidade da doença por *P. falciparum*, contudo é sempre difícil chegar a uma conclusão sobre o comportamento do

parasita havendo resultados antagônicos sobre este tema. Se já é complexo analisar cada uma destas interações individualmente, torna-se muito mais difícil prever o momento em que as densidades parasitárias vão aumentar ou diminuir, qual a espécie parasitária (a que infectou primeiro ou a que apareceu posteriormente) que vai conseguir desenvolver-se ou pelo contrário qual a que vai suprimir (Richie, 1988).

Distinguem-se dois tipos de interações: positivas e negativas. A primeira caracteriza-se pela presença de uma determinada espécie que favorece o desenvolvimento de outra, enquanto as interações negativas se caracterizam pela presença de uma espécie que inibe a presença de outra. Estes eventos foram evidenciados por Molineaux (1980) num estudo realizado com adultos nigerianos: primeiro verificou que *P. malariae* ocorria mais frequentemente associado a *P. falciparum* do que era inicialmente esperado. Num outro estudo realizado com crianças africanas demonstrou que as infecções mistas por *P. falciparum* e *P. malariae* e/ou *P. ovale* não apresentavam quaisquer tipo de sintomas e caso existissem eram muito menos graves do que as infecções simples por *P. falciparum* (Molineaux *et al.*, 1980; Mayxay *et al.*, 2004). Resultados idênticos foram obtidos num estudo no Vanuatu, com crianças com talassémia (Zimmerman *et al.*, 2004;). Outro estudo longitudinal realizado em África (Lagos) propôs alguns factores que contribuem para estas interações (positivas e/ou negativas) e parecem estar implicados na limitação da multiplicação do parasita tais como: taxa relativa de replicação, tempo de inoculação, competição de nutrientes e de glóbulos vermelhos, activação precoce dos mecanismos de defesa não específicos do hospedeiro [aumento da remoção esplénica e resposta inflamatória (febre)] (Richie, 1988).

Existe alguma controvérsia quanto aos benefícios da presença de infecções mistas no hospedeiro humano. Estudos recentes demonstraram como potenciais benefícios os seguintes: infecção mista *P. vivax* associada a baixa parasitémia de *P. falciparum* quando comparada com infecção simples apenas por esta última (Mayxay *et al.*, 2004); além disso, estas infecções parecem ter um baixo risco de falência terapêutica. Embora não confirmado, sugere-se que *P. vivax* pode atenuar a severidade da infecção por *P. falciparum*, demonstrando a evidência da imunidade cruzada entre as espécies (Mayxay *et al.*, 2004). Crianças com infecções mistas (*P. falciparum* + *P. malariae* + *P. ovale*) apresentam altos títulos de anticorpos, quando comparadas com as

infecções simples. Modelos matemáticos sugerem que nas infecções mistas por *P. falciparum* + *P. malariae*, esta segunda espécie parece reduzir o pico da parasitêmia de *P. falciparum* em 50%, enquanto *P. vivax* demonstra manter estável a parasitêmia durante a infecção aguda (Mayxay *et al.*, 2004). As baixas temperaturas corporais encontradas nas infecções mistas com *P. falciparum* sugerem que possam estar associadas ao menor fenómeno da citoaderência e consequentemente a uma manifestação menos grave da doença (Mayxay *et al.*, 2004). Contudo, alguns estudos clínicos sugerem o oposto ou seja; as infecções mistas podem estar associadas com as formas mais graves de doença, o que constitui uma séria desvantagem para o hospedeiro humano. Num estudo realizado na Índia foi demonstrado que a infecção mista por *P. falciparum* + *P.vivax* estava associada a malária cerebral e que as infecções duplas e triplas (*P. falciparum* + *P.ovale* + *P.vivax*) estavam associadas à anemia severa da malária (Mayxay *et al.*, 2004). Na Tailândia, a co-infecção *P. falciparum* + *P.vivax* em adultos estava associada a febre muito elevada, não correlacionada com as diferenças da parasitêmia (McKenzie *et al.*, 2006). Relatos de outros efeitos não benéficos da infecção mista por (*P. falciparum* + *P. vivax*), sobretudo em mulheres grávidas, associados à morte fetal ou a recém-nascidos de baixo peso, foram descritos na literatura (Mayxay *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2011).



# CAPÍTULO. 2

---

## JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS



## II. JUSTIFICATIVA

Depois de um longo período de negligência a nível mundial, a atenção da comunidade internacional foi reorientada para a necessidade urgente de controlar a malária, envolvendo-se numa iniciativa jamais vista desde a primeira campanha de erradicação tentada nos anos cinquenta. Actualmente, integrando-se nos Objectivos Estratégicos do Desenvolvimento do Milénio, o controlo da malária está na agenda política de vários dos países mais ricos do mundo e existem fundos, do Fundo Global, para combater as endemias mais prevalentes em África: VIH/Sida, Tuberculose e Malária (Dräger *et al.*, 2006; RBM/WHO, 2010a, 2010b). A vontade política em reduzir o fardo socioeconómico da malária, em África, prevê a meta da eliminação da doença, enquanto problema de saúde pública, até ao ano de 2030 (WHO/RBM, 2001). O percurso para o alcance dessa meta é árduo e carece da concepção duma base sustentável de instrumentos técnicos eficazes, duma planificação adequada, dum financiamento compatível, associado a uma forte mobilização comunitária e capacidade de investigação (MIN, 1997).

A compreensão e a identificação das causas de variabilidade individual na resposta à infecção malárica permanecem como um dos maiores desafios no tratamento e controlo da doença. Características genéticas e estado imune do hospedeiro, assim como níveis de exposição contribuem para esta variabilidade. No entanto, apesar dos progressos significativos verificados nos últimos anos, a importância relativa destes para a carga total da doença permanece pouco clara (Williams, 2006). Segundo Mackinnon (2000), as maiores fontes de variabilidade na frequência e intensidade da doença são: *factores intrínsecos do hospedeiro humano* [genética, imunidade adquirida e factores fisiológicos (idade, sexo e estado nutricional)], *factores extrínsecos ambientais* (níveis de exposição ao parasita, como localização da habitação e ocupação) e *factores temporários* relacionados com a infecção parasitária (virulência do parasita, parasitémia, aumento da temperatura como manifestação de doença, duração dos sintomas) (Mackinnon *et al.*, 2000).

Sabe-se que os factores genéticos do hospedeiro humano contribuem, significativamente, para a variabilidade da resposta individual à infecção malárica

(Weatherall *et al.*, 2002; Weatherall & Clegg, 2002; Zimmerman *et al.*, 2003; Min-Oo & Gros, 2005; Williams, 2006) e constituem um determinante principal de sobrevivência, particularmente em crianças (Min-Oo & Gros, 2005; Williams, 2006). Factores relacionados com as células sanguíneas (grupo sanguíneo ABO, drepanocitose, deficiência na glucose-6-fosfato desidrogenase - G6PD) têm sido, tradicionalmente, estudados e relacionados com a gravidade da malária causada por *P. falciparum* (Hill 2001; Verra *et al.*, 2009).

A variante *HbS* não parece diminuir o risco de infecção por *P. falciparum*, mas evidencia ser protector contra as formas graves de doença, provavelmente porque dificulta a invasão e crescimento dos parasitas no interior dos eritrócitos (Pasvol *et al.*, 1978; Min-Oo & Gros, 2005), no entanto, a malária é muitas vezes fatal em indivíduos *HbSS*. Algumas teorias defendem que a protecção contra a infecção malárica parece funcionar de modo dose-dependente do alelo *HbS* (Ashley-Koch *et al.*, 2000), i.e., indivíduos *HbSS* têm um risco ainda menor de infecção quando comparados com os indivíduos *HbAS* (Ashley-Koch *et al.*, 2000).

A G6PD catalisa o primeiro passo da cadeia de hexose monofosfato que mantém o equilíbrio redox da glutatona. As mutações que reduzem a actividade da G6PD têm sido associadas com a protecção contra a malária. O efeito benéfico destas mutações pode ser consequência da redução do crescimento parasitário no interior dos eritrócitos, por induzir uma fagocitose mais eficiente das células parasitadas ou porque as células deficientes em G6PD são mais frágeis ao dano oxidativo induzido pelo parasita do que as células normais (Yuthavong *et al.* 1990).

A sobreposição da distribuição geográfica de algumas desordens genéticas da hemoglobina com áreas onde a malária foi ou é endémica tem sido atribuída à pressão selectiva do parasita sobre o genoma humano, sugerindo que a elevada frequência de determinadas variantes genéticas é mantida devido à protecção (particularmente quando em heterozigotia) que confere à doença (Weatherall *et al.*, 2002). A componente genética de susceptibilidade à malária é complexa e multigénica, por conseguinte a identificação de tais polimorfismos não é uma questão meramente académica ou de obstinação científica, mas sobretudo crucial à compreensão dos mecanismos de interacção entre o parasita e o hospedeiro humano, de modo a suscitar novas abordagens para a prevenção, tratamento e controlo da doença (Williams, 2006).



Sabe-se que na maior parte do mundo onde a malária é endémica as infecções envolvendo duas ou mais espécies, em simultâneo, são comuns (Richie, 1988; Bruce *et al.*, 2008). Contudo, o impacto clínico destas co-infecções continua pouco claro e a sua investigação bastante negligenciada. A grande maioria das pesquisas clínicas focalizam-se na malária por *P. falciparum*, sem grande referência aos efeitos potenciais da co-ocorrência de espécies. No entanto, existem relatos de possíveis interações que poderão ocorrer entre as diferentes espécies de *Plasmodium* quando infectam, em simultâneo, um mesmo hospedeiro. Estas interações poderão afectar a dinâmica de infecção, a mortalidade (Marques *et al.*, 2005) e a transmissão (Arez *et al.*, 2003). Apesar disso, poucos estudos têm abordado o tema das infecções mistas, como salientado por diversos autores (Mayxay *et al.*, 2004, Snounou & White, 2004; Zimmerman *et al.*, 2004). Alguns relatos parecem indicar que a presença de outra espécie atenua a gravidade da malária causada por *P. falciparum* (Black *et al.*, 1994, Williams *et al.*, 1996, Collins & Jeffery 1999), mas até ao momento, nenhum estudo comparativo entre grupos com diferentes manifestações clínicas de malária foi efectuado com esse fim.

A malária, globalmente, é considerada como a mais importante causa de mortalidade e incapacidade nos países da África Subsariana, devido sobretudo às alarmantes taxas de morbi-mortalidade em crianças menores de cinco anos. Constitui, ainda, um sério obstáculo ao desenvolvimento económico das nações e é uma ameaça constante à saúde, bem-estar e estabilidade económica para milhões de pessoas. Situação esta, agravada por factores de ordem socioeconómica e epidemiológica como pobreza extrema, migração das populações, falência dos sistemas de saúde, degradação do sistema sanitário, alterações geoclimáticas, aumento da população vectorial, fenómeno da multirresistência parasitária e vectorial, entre outros.

Em Angola, a malária continua a ser um importante problema de Saúde Pública, agravado por mais de 30 anos de guerra civil que assolou o país até 2002. Esta obrigou a intensos movimentos migratórios que promoveram a alteração do padrão epidemiológico das doenças parasitárias e contribuiu para a destruição das infra-estruturas sanitárias, impedindo a implementação de medidas de vigilância e controlo antimaláricas eficazes.

No pós-guerra, Angola tem vivido um período muito rico em termos de transformações sócio-económicas, com especial incidência nesta fase do processo de reconstrução e de reconciliação nacional. Vivem-se momentos de grandes mudanças no panorama internacional e de muitas expectativas no plano nacional. A política do Governo in" *Estratégia de Desenvolvimento a Longo Prazo - Angola 2025* " (MINPLA/INE, 2009), preconiza o controlo das grandes endemias, como uma das prioridades.

Nos últimos anos, em colaboração com o CMDT/IHMT/UNL, foi iniciada uma linha de investigação com o objectivo de identificar as interacções entre as características do hospedeiro e factores parasitários. Miranda *et al.*, (2007), num estudo realizado em 250 crianças, dos seis aos catorze anos, confirmaram a presença de *P. ovale*, antes controversa no país e demonstraram que a frequência do alelo *HbS* predominava nos indivíduos infectados assintomáticos. A frequência de deficiência em G6PD (gene *G6PD*), quando comparada com a referida para a região Africana, foi relativamente baixa (Miranda *et al.*, 2007).

Estudos recentes (Mendes *et al.*, 2007), sobre a prevalência de infecção por *Plasmodium sp*, na província do Cuanza Sul-Angola, demonstraram prevalências das espécies plasmódicas diferentes das previamente descritas (Webster, 2001; PNCM, 2006) (*P. falciparum* 98% versus 92%; *P. malariae* 12.2% versus 1%; *P. ovale* 4.9% versus 0% e *P. vivax* 2.4% versus 7%).

Entre os vários factores de variabilidade na resposta à malária, propusemo-nos avaliar a contribuição de alguns polimorfismos genéticos relacionados com as células sanguíneas e da composição da(s) população(ões) parasitária(s) na susceptibilidade à infecção e evolução clínica comparando três grupos de indivíduos: infectados assintomáticos (IA), doentes com malária não complicada (Mnc) e doentes com malária grave (MG).

## II.1. OBJECTIVOS

### II.1.1. Objectivo Geral

Determinar o efeito de alguns factores genéticos do hospedeiro (polimorfismo eritrocitário) e factores parasitários (composição parasitária da infecção) na susceptibilidade à malária e gravidade da doença.

### II.1.2. Objectivos Específicos

1. Estudar factores do hospedeiro humano, que determinam a susceptibilidade à malária e a sua evolução clínica, nomeadamente:

1.1. Drepanocitose ( $\alpha$ -globina, gene *HBB*)

1.2. Deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, gene *G6PD*)

2. Estudar as populações parasitárias, no que respeita à identificação das espécies de *Plasmodium* presentes na infecção.

3. Relacionar os parâmetros anteriores com o estado clínico dos indivíduos estudados.

## II.2. HIPÓTESES DE TRABALHO

Dada a inexistência de informação, em Angola, sobre a prevalência dos polimorfismos dos genes *HBB*, *G6PD* e da composição parasitária da infecção, foi necessária a realização prévia de um estudo exploratório.

A. Comprovada a existência de factores do hospedeiro (gene *HBB* e gene *G6PD*) e de factores parasitários (composição parasitária da infecção), implicados na susceptibilidade à malária e evolução clínica da doença, pretendemos identificar se existia associação entre estes factores e os três grupos de estudo (doentes com MG, doentes com Mnc e IA).

Ho [hipótese nula]: Não existe associação entre os polimorfismos do gene *HBB*, *G6PD*, composição parasitária da infecção e os diferentes grupos de estudo (IA, MG e Mnc).

H1 [hipótese alternativa]: Existe associação entre os polimorfismos do gene *HBB*, *G6PD*, composição parasitária da infecção e os diferentes grupos de estudo (IA, MG e Mnc).

B. Associar os parâmetros (polimorfismo eritrocitário e composição parasitária da infecção) aos diferentes grupos de estudo.

# CAPÍTULO. 3

---

## MATERIAL E MÉTODOS



### III. MATERIAL E MÉTODOS

A inexistência de informação oficial, durante a planificação do projecto de estudo, sobre a prevalência de infecções mistas e dos polimorfismos eritrocitários (variante HbS e variante G6PDA<sup>-</sup>), levou-nos a efectuar a pesquisa em distintas províncias do país com diferentes características (culturais, etno-linguísticas, sócio-demográficas, geoclimáticas, microgeográficas e de transmissão da malária). A descrição de alguns aspectos sócio-demográficos da população do país, nos seus diferentes contextos urbano e rural, revela-se de grande interesse para a contextualização e compreensão da pluralidade dos resultados do estudo.

#### III.1. Áreas de Estudo

##### III.1.1. Características sócio-demográficas de Angola

Angola, que esteve sob administração colonial portuguesa a partir de 1475, tornou-se um Estado independente em Novembro de 1975, sem que essa mudança política tenha, efectivamente, tido os efeitos benéficos esperados, pois a guerra civil prolongou-se até Abril de 2002. Na realidade, o processo de reconstrução e de reconciliação nacional tem menos de uma década.

O último Censo Nacional da População foi realizado em 1971 e prevendo-se a realização do primeiro Censo Nacional após a independência, para 2013/2014. Assim, os dados populacionais disponíveis são estimativas ou projecções de inquéritos de base populacional, como o IBEP<sup>5</sup> - Inquérito Integrado de Bem-Estar da População - cuja colheita de dados foi realizada em 2008/9 (INE, 2010), o que relativiza e condiciona a

---

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Estatística / Ministério do Planeamento da República de Angola - Inquérito Integrado Sobre o Bem-Estar da População (IBEP) 2008-09.

análise de indicadores cujo denominador seja a população total ou estratos da mesma. Segundo o último relatório do Fundo das Nações Unidas para a População [*United Nations Population Fund*- (UNFPA)], sobre o “*Estado de la población mundial 2010*” (UNFPA, 2010), a população total de Angola estimada, para 2010, era de 19 milhões de habitantes, com uma densidade populacional de 15 habitantes por km<sup>2</sup> e uma taxa média de crescimento demográfico entre 2005 e 2010 de 2,7 %. Com um processo de urbanização acelerado, a população urbana representava 59% da população e a taxa de crescimento demográfico urbano era de 5,7%. Este processo é mais concentrado nas áreas urbanizadas de Luanda e Lobito (Benguela). O Escritório de População do Departamento de Assuntos Económicos e Sociais das Nações Unidas (*Population Division of Department of Economic and Social Affairs of United Nations*) estimava que, em 2010, 17,7 % da população teria menos de cinco anos e 75,5% menos de 24 anos. A população maior de 60 anos foi estimada em 6,7 %. O rácio da população por sexo era de 98,1 homens por 100 mulheres. Destas, 45 % teriam entre 15 e 49 anos de idade (UN DESA, 2010).

Depois de 2002, significativos progressos se têm verificado a nível macroeconómico, com crescimento médio do Produto Interno Bruto (PIB) até 2008 de 17 % ao ano, com redução persistente da taxa de inflação, que passou de mais de 100 % para cerca de 13,2% em 2008. Em 2009 (2,4%) e 2010 (3,4%) o país continuou a crescer, mas a níveis mais baixos, estimando-se que taxas de crescimento de dois dígitos se venham a verificar a partir de 2012 (Júnior, 2011).

O efectivo escolar não universitário passou de 2,5 milhões de alunos em 2002 para 6,1 milhões em 2010, tendo-se verificado no mesmo período uma progressão a nível de estudantes universitários de 13 mil para 117 mil, distribuídos por sete regiões académicas. Foram criadas sete novas universidades públicas que coexistem com 12 instituições universitárias privadas (Júnior, 2011).

Segundo os resultados do IBEP (INE, 2010) o nível de pobreza atingiria 36,6% da população, com diferenciais significativos entre áreas urbanas (18,7%) e rurais (58,3%). Outros indicadores com diferenciais importantes entre áreas urbanas e rurais são os seguintes:



	Angola	Áreas Urbanas	Áreas Rurais
Habitação não Apropriada (%)	****	90	****
Acesso a água potável (%)	42	57,9	31,1
Acesso a saneamento básico (%)	59,6	84,6	31,1
Acesso a electricidade (%)	40,2	66,3	8,6
Acesso a combustível sólido (%)	61,3	33,4	92
Acesso a telemóvel (%)	32,6	52,8	6,3

Segundo o mesmo relatório (INE, 2010), a distribuição da população por grupos etários, género e locais de habitação, em 2009, mostra diferenças significativas (Tabela III.1.1).

Tabela III.1.1. Distribuição (%) da população de Angola, por grupos etários, género e locais de habitação - INE/ IBEP, 2010

IDADE	URBANO			RURAL			TOTAL		
	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres	Total
< 15 anos	47.5	45.4	46.4	50.7	47.9	49.3	49.0	46.5	47.7
15-59 anos	50.8	52.9	51.9	45.1	49.1	47.1	48.2	51.2	49.7
60 anos e mais	1.7	1.7	1.7	4.2	3.0	3.6	2.8	2.3	2.6
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Fonte: INE (2010)

Para uma visão de Angola no contexto Regional ver Tabela III.2 abaixo. Segundo o relatório do Banco Mundial (Word Bank, 2010) citamos: “*Após o final de uma guerra de décadas, em Abril 2002, Angola regista um substancial progresso em termos económicos e políticos. No entanto o país continua a enfrentar enormes desafios ao desenvolvimento incluindo a redução da dependência do petróleo e a diversificação da economia, a reconstrução das suas infra-estruturas, o melhoramento da capacidade institucional, da governação, dos sistemas de gestão financeira pública, indicadores de desenvolvimento humano e condições de vida da população.*” Na Tabela III.1.2, apresentamos alguns indicadores sócio-demográficos de Angola e de outros países africanos, enquadrados no contexto africano.

Tabela III.1.2. Angola no contexto Regional Africano

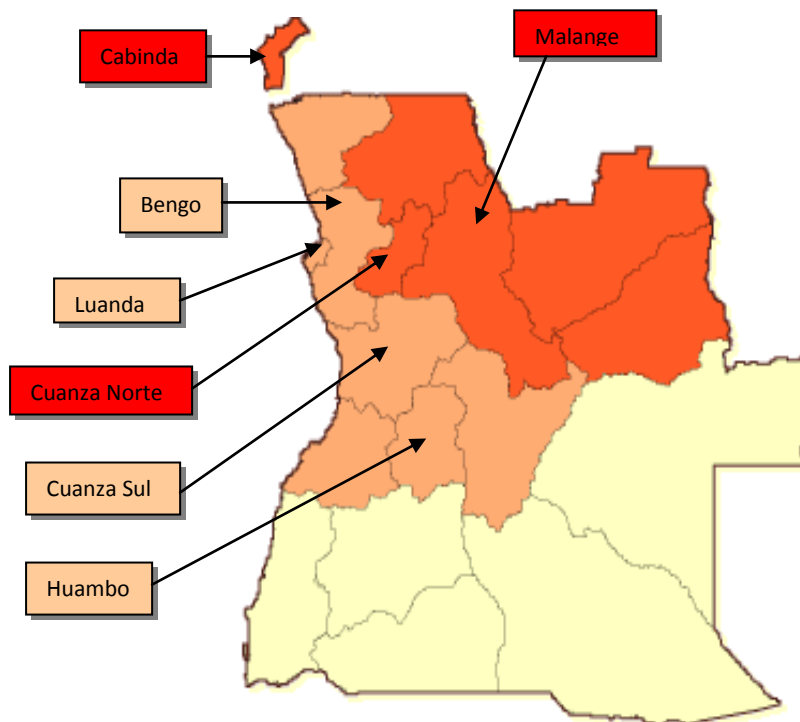
	África	África Austral	Zâmbia	Angola	Fonte
População/milhões (2010)	1000,9	58,0	13,3	19,0	UNFPA (2010)
Taxa média de crescimento demográfico 2005-2010 (%)	2,3	1,0	2,4	2,7	UNFPA (2010)
% População urbana (2010)	40	59	36	59	UNFPA (2010)
Taxa média de crescimento urbano 2005-2010 (%)	3,4	1,9	2,8	5,7	UNFPA (2010)
Taxa de fecundidade total (2010)	4,45	2,55	5,64	5,53	UNFPA (2010)
PNB per capita PPA (2008) USD			1230	5020	UNFPA (2010)
Mortalidade ≤ 5 anos por 1 000 nados vivos. Período (2005-2010) (Masculino/Feminino)	142/130	80/65	169/152	220/189	UNFPA (2010)
Mortalidade menores 1 ano por 1000 nados vivos (2010)	79	43	87	111	UNFPA (2010)
Rácio Mortalidade Materna por 100 000 nados vivos (2005)	820	900	830	1400	UNFPA (2010)
Esperança de vida ao nascer (2010) (Masculino/Feminino)	53,8/56,2	50,8/53,1	46,7/47,8	46,1/50,1	UNFPA (2010)
% de analfabetos >15 anos (2005-2008) (Masculino/Feminino)			19,4/39	17,2/43	UNFPA (2010)
Taxa de prevalência VIH % (Mulheres dos 15-49 anos) (2007)			15,2	2,1	UNFPA (2010)
Consumo de energia per capita (2007)			604	606	UNFPA (2010)
Acesso a água potável % (2006)			58	51	UNFPA (2010)
Médicos (números absolutos)			649 (2006)	1165 (2004)	WHO, 2011
Enfermeiros e Parteiras (números absolutos)			8 389 (2006)	18 495 (2004)	WHO, 2011
% Despesas governamentais em saúde em relação ao total de despesas (2009)			10,8	8,4	WHO, 2011
Per capita despesas governamentais em saúde (USD) (2009)			25	316	WHO, 2011

Fonte: UNFPA (2010) e WHO (2011)




### III.1.2. Locais de Estudo

A pesquisa foi realizada em sete províncias do país, com diferentes níveis de transmissão da malária: *hiperendemia* (Cabinda, Cuanza Norte e Malange) e *mesoendemia estável* (Bengo, Cuanza Sul, Huambo, Luanda) de Julho de 2006 a Maio de 2010 (Figura III.1.1).

Figura III.1.1. Mapa de Angola - sinalização das províncias envolvidas no estudo de acordo com os diferentes níveis de endemicidade



Fonte: Retirado e adaptado de Mapa de Angola - Résultats de l'enquête MIS (Malaria Indicator Survey) Angola, 2006. [http://www.rollbackmalaria.org/countryaction/angola\\_mis.html](http://www.rollbackmalaria.org/countryaction/angola_mis.html)

-  - Áreas de mesoendemia instável
-  - Áreas de mesoendemia estável
-  - Áreas hiperendémicas

### III.1.2. a – Bengo

Bengo é uma província localizada no norte de Angola (Latitude Sul 8° 33', Longitude Este 13° 40' e Altitude - 20 m), criada a 26 de Abril de 1980, por desagregação da província de Luanda. Tem uma superfície de 41.000 km<sup>2</sup> e uma população estimada em 271.942 mil habitantes (INE, 2010). Composta sobretudo por etnia Ambundu assistiu-se, em consequência da guerra civil, à integração de outros grupos étnicos como os Bakongos e Ovimbundus. A província tem cinco municípios: Ambriz, Dande, Ícolo e Bengo, Nambuangongo e Muxima. A capital é a cidade de Caxito, no município de Dande. O clima é tropical seco na maior parte do ano. A temperatura média anual é de 28,4°C. Dada a presença do rio Bengo a província é auto-suficiente no sector agrícola (cultivam-se café, mandioca, abacate, ananás, sisal, dendém, cana-de-açúcar e produtos hortícolas) e nas pescas.

O estudo decorreu durante o início da época do cacimbo (estação fria e seca), imediatamente após o término das chuvas, durante o mês de Maio de 2007 (Tabela III.4). As colheitas de amostras sanguíneas foram realizadas no município de Icolo-Bengo (Comunas da Funda e Muculo).

### III.1.2. b – Cabinda

Cabinda, anteriormente conhecida como Congo Português é a capital da província do mesmo nome. Constitui o principal suporte económico do país devido a extracção de aproximadamente 70% do petróleo exportado. Localizada na costa do Oceano Atlântico tem uma superfície: 7.270 km<sup>2</sup>, Latitude Sul 8° 49', Longitude Este 13° 13' e Altitude 44 m. O clima é do tipo tropical húmido. A temperatura média anual é de 25°C, a média anual das precipitações é muito fraca, cerca de 340 mm. Tem a segunda maior reserva florestal do mundo, depois da Amazónia, sendo a produção de madeira uma alternativa económica à exploração do petróleo. As vastas florestas são ricas principalmente em café, cacau e oleaginosas. Cultivam-se, tradicionalmente, a mandioca, a batata-doce e banana, que constituem a base da alimentação das populações de Cabinda. As migrações provocadas sobretudo pela guerra, particularmente o regresso

dos exilados da República vizinha do Congo, alteraram a dimensão e distribuição da população de Cabinda, estimando-se, em 2009, segundo dados do INE (2010), em 349.501 mil habitantes. Tem quatro municípios (Cabinda, Lândana, Bucu-Zau e Belize).

As colheitas das amostras sanguíneas foram realizadas no município de Cabinda (Centro de Saúde Chinga e Centro de Saúde Povo Grande) durante a época das chuvas e o início do cacimbo, respectivamente, em Abril e Maio de 2008.

### III.1.2. c – Cuanza Norte

Cuanza Norte é uma província situada a norte do Rio Cuanza, que o separa da província do Cuanza Sul. Tem uma superfície de 24.110 Km<sup>2</sup>, 9° 17' de Latitude Sul e 14° 55' Longitude Este, com Altitude de 798 metros e uma população estimada em 291.251 habitantes (INE, 2010). A capital é a cidade de N'dalatando, que dista de Luanda 248 km. Tem treze municípios: Cazengo, Lucala, Ambaca, Golungo Alto, Dembos, Bula Atumba, Cambambe, Quiculungo, Bolongongo, Banga, Samba-Cajú, Gonguembo e Pango Aluquém. O clima é tropical húmido e a temperatura média anual é de 20°C. É limitada pelas províncias do Uíge (Norte), Cuanza Sul (Sul), Bengo (Este) e Malange (Oeste). A população é predominantemente agrícola, tendo como principais produções o milho, amendoim, abacate e o ananás. A província tem numerosos recursos minerais e hídricos, estando a primeira maior barragem hidroeléctrica do país construída no município da Cambambe.

Nesta província procedemos à recolha das amostras sanguíneas no Hospital provincial da capital (N'dalatando), durante o mês de Maio de 2010 (início da época de cacimbo).

### III.1.2. d – Cuanza Sul

Localizada no sudoeste de África, foi fundada em 1769, tem uma superfície 55.660 Km<sup>2</sup> e uma população estimada em 1.036.518 mil habitantes (INE, 2010). A capital da província é a cidade do Sumbe. Tem 12 Municípios (Sumbe, Porto Amboim, Quibala, Libolo, Mussende, Amboim, Ebo, Quilenda, Conda, WaKu Kungo, Seles e Cassongue). O clima é tropical seco (a maior parte do ano). Os meses mais quentes vão

de Janeiro a Abril e os mais frios de Julho a Agosto. Devido à guerra, o mosaico da população é hoje constituído por diferentes grupos étnicos não homogéneos (Kibalas, Ngoias, Mus, Seles, Mussumbas e Bailundos). A província tem grandes potencialidades agro-pecuárias e piscatórias. A actividade é fundamentalmente piscatória (crustáceos), mas o cultivo do café, do milho e do feijão constituem a subsistência da maioria das famílias da região.

A recolha das amostras sanguíneas na província do Cuanza Sul foi realizada em três municípios: [Porto Amboim, Amboim e Sumbe (Bairros da Kissala e da Praia)], durante o mês de Julho de 2006 (época fria e seca).

### III.1.2. e – Huambo

Huambo é uma província localizada na região centro-sul do país. Latitude 12° 48' Sul, Longitude 15° 45' Este e Altitude 1.700 metros, tem uma área aproximada de 35.771 km<sup>2</sup> e uma população aproximada de 1.239.777 habitantes de etnia predominantemente Umbundo (INE, 2010). A maioria da população de Huambo é de origem Ovimbundu. A capital é a cidade de Huambo, que dista de Luanda 600 km. Tem onze municípios: Huambo, Bailundo, Ekunha, Caála, Catchiungo (ex-Bela Vista), Longuimbale, Longonjo, Mungo, Tchicala-Tcholoanga (ex-Vila Nova), Tchindjenje e Ucuma (ex-Cuma). É limitada pelas províncias do Cuanza Sul (Norte), Bié (Este), Huíla (Sul) e Benguela (Oeste). A maior altitude da província (e do país) situa-se no Morro do Moco, com mais de dois mil metros de altitude, de onde nascem numerosos rios e riachos em direcção ao litoral e países vizinhos. A população é predominantemente agrícola, existindo no entanto outros potenciais de desenvolvimento económico - a exploração do subsolo (manganês, diamantes, volfrâmio, ferro, ouro, cobre e mineiro radioactivo).

A nossa pesquisa foi realizada no município do Huambo - Hospital provincial e Centro de Saúde da Comuna da Mineira, durante os meses de Abril e Maio de 2009, respectivamente durante a época das chuvas e o início do tempo frio e seco

### III.1.2.f – Luanda

Luanda foi fundada em 1575 (anteriormente conhecida como São Paulo da Assunção de Loanda), é a capital do país, a província mais industrializada e com maior crescimento económico. Localizada na costa do Oceano Atlântico, tem uma superfície: 241.778 km<sup>2</sup>, Latitude 8° 49' Sul, Longitude 13° 13' Este e Altitude 44 m. O clima é semi-árido e árido no litoral (do tipo tropical quente e seco), com duas distintas estações por ano: o cacimbo e a estação quente e das chuvas. A temperatura média anual é de 25°C e a média anual das precipitações é muito fraca, cerca de 340 mm. Dois grandes e importantes rios atravessam a província de Luanda: a norte o Bengo e a sul o Cuanza. Esses rios dão lugar a planícies de aluviões muito férteis, das quais depende o desenvolvimento duma agricultura de subsistência; cultivam-se tradicionalmente a mandioca, milho, batata-doce, amendoim, feijão e hortícolas, que constituem a base da alimentação das populações de Luanda.

As migrações provocadas sobretudo pela guerra alteraram a dimensão e distribuição da população de Luanda; é a província mais populosa do país, estimando-se que actualmente a capital tenha uma população de aproximadamente 10 milhões de habitantes (estimativa da ONU em 2004), embora as estimativas do INE (2010) apontem para 4.749.423 de habitantes. Luanda é o principal porto do país e centro administrativo de Angola e tem nove municípios (Cazenga, Ingombota, Kilamba Kiaxi, Maianga, Rangel, Samba, Sambizanga, Cacuaco e Viana).

Realizámos em Luanda colheitas de amostras sanguíneas, em dois municípios: Rangel e Maianga, onde se encontram localizados respectivamente o Hospital Américo Boavida (Serviços de Urgência, Doenças Infecciosas e Parasitárias e Pediatria), o Centro de Saúde da Terra Nova e a Clínica da Mutamba (esta no município da Maianga), entre os anos de 2006 e 2010, em diferentes meses, independentemente da época sazonal.

### III.1. 2.g – Malange

Malange está localizada na região centro norte do país, aproximadamente a 423 km de Luanda. Confinha a Norte e a Noroeste com a província do Uíge, a Oeste com a

província do Cuanza Norte, Sudoeste com a província do Cuanza Sul, a Sul com a província do Bié, a Este com as Lundas Norte e Sul e a Nordeste com a República Democrática do Congo. Tem uma superfície de 97.602 Km<sup>2</sup> e uma população estimada, em 2009, de 893.137 mil habitantes<sup>6</sup>. A capital da província é a cidade de Malange. A província está dividida, do ponto de vista administrativo, em 14 municípios e 51 comunas: Malange, Mucuso, Kalandula, Caculama, Kangandala, Kambundi-Katembo, Quela, Cahombo, Kiwaba-Nzaji, Massango, Marimba, Luquembo, Quirima, Kunda-Dia-Base. A província integra-se em três zonas ecológicas distintas:<sup>7</sup> o Planalto de Malanje, a Baixa de Kassanje e o Songo ou Alto Cuanza. O clima do planalto é tropical chuvoso com duas estações bem diferenciadas: a estação das chuvas que vai de Setembro a Abril, caracterizada por precipitações médias anuais que vão de 900 mm na faixa ocidental a 1.200 mm na faixa oriental e até 1.400 mm, na parte norte, com temperaturas médias anuais entre os 21 e 22°C e uma estação seca (cacimbo) que dura aproximadamente cinco meses, com temperaturas médias sensivelmente semelhantes às médias anuais, sem grandes oscilações térmicas diurnas. As populações são essencialmente agrícolas, vivendo muitas famílias numa agricultura de subsistência, apesar das grandes potencialidades hidrominerais da província (diamantes, minerais radioactivos e cobre).

As colheitas das amostras sanguíneas foram realizadas em dois municípios: (Malange e Kalandula) respectivamente no Hospital Provincial e no Posto de Saúde, durante o mês de Maio de 2010.

### III.2. Tipologia do Estudo

A inexistência em Angola de estudos de biologia e genética molecular, que permitissem o conhecimento da prevalência dos polimorfismos do hospedeiro humano e

---

<sup>6</sup> Governo da Província de Malange- Plano de Reabilitação e Desenvolvimento da Província, 2011.

<sup>7</sup> Missão de Inquéritos Agrícolas de Angola (MIAA) (s/data)



parasita, antes da realização desta investigação, levou-nos efectuar um *estudo exploratório*, seguido de um *estudo de caso-controlo*.

### III.3. População Estudada

#### III.3.1. Critérios de Inclusão

##### **a) *Estudo exploratório***

Para o estudo exploratório utilizamos uma amostragem por conveniência, tendo sido seleccionados indivíduos com idade superior a seis meses, que satisfizessem o único critério de inclusão: ausência de sintomas clínicos, nomeadamente febre ou história recente de febre, no momento da observação e infecção por *Plasmodium sp*, confirmada por microscopia óptica (MO). Algumas das crianças da faixa etária dos maiores de seis meses e menores de cinco anos foram seleccionadas no decorrer da campanha de vacinação e as restantes (grupos etários) foram seleccionadas nas comunidades. Foram excluídos todos os indivíduos que referiam febre, história recente de febre ou outras doenças associadas debilitantes definidas nos critérios de exclusão.

##### **b) *Estudo analítico caso-controlo***

Para o estudo analítico caso-controlo obtivemos uma amostra estratificada de indivíduos pertencentes a três grupos diferentes (infectados assintomáticos, doentes com malária não complicada e doentes com malária grave). Foram seleccionados indivíduos com idade superior a seis meses, que satisfizeram os seguintes critérios de inclusão: (1) portador de doença definidora de malária grave (MG) segundo os critérios da OMS (WHO, 1990; 2000a; 2000b; 2010b); (2) doentes com malária não complicada (Mnc) segundo a definição da OMS (WHO, 1990; WHO, 2006b; 2010b) e (3) indivíduos com infecção assintomáticos. Para este grupo, seleccionámos todos os infectados com *Plasmodium sp.*, confirmado por PCR, que não apresentaram febre ou história prévia de febre no momento da observação. Os doentes dos dois grupos clínicos (1 e 2), foram

seleccionados nos Hospitais, Centros e/ou Postos de Saúde das províncias onde desenvolvemos a pesquisa.

**c) Definições operacionais ou variáveis em estudo:**

- a) *Infecção assintomática (IA)* - De acordo com a definição epidemiológica (WHO, 1990; Coura *et al.*, 2006) consideraram-se infectados assintomáticos *todos os indivíduos com ausência de sintomas clínicos, nomeadamente febre ou história recente de febre, no momento da observação, com infecção por Plasmodium sp, confirmada por PCR;*
- b) *Malária não grave/não complicada*, neste estudo optou-se pela denominação de *malária não complicada (Mnc)*, definida segundo a OMS como: *malária sintomática, sem sinais de severidade ou de evidência clínica e/ou laboratorial de disfunção de um ou mais órgãos vitais, que evolui geralmente com sintomas e sinais inespecíficos, na presença de parasitemia assexuada de Plasmodium sp.* (WHO, 1990; WHO, 2006b; 2010b) confirmada por PCR;
- c) *Malária Grave (MG)* segundo a definição da OMS: *Todas as situações em que o doente apresenta parasitemia assexuada de P. falciparum com sintomatologia evidente e exclusão de outras causas dos sintomas, na presença de um ou mais dos critérios clínicos e/ou laboratoriais de gravidade* (WHO, 1990; 2000a; 2000b; 2010b) (Tabela III.1.3);
- d) *Idade* – definida como: “*número de anos que uma pessoa conta desde o seu nascimento até à época de que se fala*” (Dicionário Integral de Língua Portuguesa, 2009). Esta variável foi recodificada na base de dados adoptando a designação de grupo etário. Para este trabalho foram criados três grupos etários ( $\leq 5$  anos, 6-14 anos e um último a partir dos 15 anos). Optamos por esta distribuição tendo em conta a prevalência da infecção nas áreas endémicas de malária, consideradas mais elevadas em crianças menores de cinco anos de idade;
- e) Polimorfismos genéticos: *G6PD*, *HBB*, *Antigénio Duffy* - definidos na secção referente ao polimorfismo eritrocitário;
- f) Parâmetros clínicos: *Malária Cerebral (MC)*; *Anemia Severa da Malária (ASM)*, *Disfunção Multiorgânica (DM)*, *Hiperparasitemia (HP)* - definidos segundo a OMS na secção referente a patogenese da malária.

Tabela III.1.3. Indicadores de malária grave e sinais de mau prognóstico

<b>Malária cerebral</b>	Coma não despertável, que persiste para além dos 30 minutos depois de uma convulsão generalizada, excluídas outras causas de coma, com um Score $\leq 9$ na escala de coma Glasgow ou $<2$ na escala de Blantyre (crianças)
<b>Anemia Severa</b>	Hematócrito $< 15\%$ ou Hemoglobina $< 50$ g/L, na presença de parasitémia $>10.000/\mu\text{l}$
<b>Insuficiência Renal</b>	Diurese $<400$ ml/24 horas em adultos ( $<12$ ml/kg/24 horas em crianças) e uma creatinina sérica $> 265$ $\mu\text{mol/l}$ ( $> 3,0$ mg/dl) apesar da reposição adequada do volume
<b>Edema Pulmonar Agudo e Síndrome distress respiratório (SDRA)</b>	O score de lesão pulmonar aguda é calculado com base na densidade radiográfica, na gravidade da hipoxemia e pressão positiva expiratória final
<b>Hipoglicemia</b>	Concentração de glicose no sangue total $<2,2$ mmol /l ( $<40$ mg / dl)
<b>Colapso circulatório (malária algida)</b>	Pressão arterial sistólica $<70$ mmHg em pacientes $> 5$ anos de idade ( $<50$ mmHg em crianças com idade entre 1-5 anos), com a pele fria e húmida ou uma diferença de temperatura central para a da pele $> 1^\circ\text{C}$
<b>Sangramento anormal e / ou coagulação intravascular disseminada</b>	Hemorragias espontâneas da gengiva, nariz, do trato gastrointestinal, ou evidência laboratorial de coagulação intravascular disseminada.
<b>Convulsões generalizadas repetidas</b>	$\geq 3$ Convulsões observadas em 24 horas
<b>Acidemia / Acidose</b>	pH arterial $<7,25$ ou acidose (bicarbonato no plasma $<15$ mmol/l)
<b>Hemoglobinúria macroscópica</b>	Hemólise não secundária à deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase
<b>Alterações do estado de consciência</b>	Estado de confusão mental
<b>Prostração ou fraqueza</b>	Incapacidade para se manter sentado
<b>Hiperparasitémia</b>	$> 5\%$ de eritrócitos parasitados ou $> 250.000$ parasitas/ $\mu\text{l}$ (em indivíduos não imunes)
<b>Hiperpirexia</b>	Temperatura corporal $> 40^\circ\text{C}$
<b>Hiperbilirrubinemia</b>	Bilirrubina total $> 43$ $\mu\text{mol/l}$ ( $> 2,5$ mg/dl)+ sinais de disfunção orgânica

Fonte: Retirado e adaptado de WHO (1990; 2000a, 2000b, 2010b) e Trampuz *et al.* (2003).

### III.3.2. Critérios de Exclusão

Os critérios de exclusão propostos foram utilizados em todos os grupos seleccionados, quer no estudo exploratório quer no estudo de caso-controlo. Foram excluídos, em ambos, todos os doentes com doenças associadas debilitantes conhecidas (co-infecção VIH, Malnutrição, Diarreia, Pneumonia, Diabetes, IRC, Colagenoses e história de hemotransfusão no decurso do internamento).

### III.4. Colheita das Amostras e Material Biológico

As amostras de acordo com a tipologia do estudo foram obtidas, após observação clínica, através da colheita de sangue periférico por punção venosa, para esfregaço sanguíneo e gota espessa (duas lâminas, por cada indivíduo, para observação microscópica), em papel de filtro (Schleicher & Schuel - referência S&S® 903™). Este foi conservado seco à temperatura ambiente segundo o protocolo de colheita do CMDT/IHMT para posterior extracção de DNA em phenol/phenol-clorofórmio e precipitação de etanol, processo que decorreu no laboratório do Centro de Malária e outras Doenças Tropicais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical da Universidade Nova de Lisboa, em Portugal.

A recolha do material biológico para o estudo exploratório foi realizada em sete municípios de três províncias do país com transmissão mesoendémica estável: Cuanza Sul [municípios Porto Amboim, Amboim e Sumbe (Bairros da Kissala e da Praia)], Bengo (Comunas da Funda e Muculo) e Huambo (município Sede e Mineira), em três épocas distintas, Julho de 2006, Maio de 2007 e Abril de 2009, respectivamente. (Tabela III.1.4). Para este estudo, o consentimento livre e informado dos pacientes ou dos seus representantes legais foi obtido verbalmente.

Para o estudo de caso-controlo, as amostras de DNA obtidas a partir de sangue periférico foram recolhidas em diferentes unidades hospitalares do país, respeitando os critérios de inclusão e exclusão já apresentados em detalhe na secção anterior, em crianças com idade superior a seis meses e adultos, com doença definidora de malária não complicada ou grave, segundo os critérios da OMS. Em simultâneo, foi preenchida, pelo paciente ou seu representante legal, a Declaração do Consentimento Livre e Informado (Anexo. 2). Para cada paciente foi preenchido um questionário (Anexo. 1), que incidiu sobre os dados sócio-demográficos (idade, género, local de residência, ocupação), antecedentes pessoais relacionados com a exposição prévia à infecção (história anterior de malária, número de infecções/malária/ano, história prévia de anemia, sintomas clínicos na admissão, avaliação laboratorial, parasitemia na admissão, tratamento administrado e evolução clínica). As amostras foram obtidas nas seguintes localidades (Tabela III.1.4):

- a) Luanda [Hospital Américo Boavida – (Serviços de Urgência, Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias e Serviço de Pediatria) e Clínicas Privadas - (Clínica da Mutamba e Sagrada Esperança)] foram seleccionados 93 doentes, no período de Junho de 2006 a Maio de 2010;
- b) Cuanza Sul [Hospital Central do Sumbe – (Serviço de Pediatria)] - foram seleccionados 33 doentes em Julho de 2006;
- c) Bengo – Município da Funda (Centro de Saúde) - foram seleccionados 8 doentes em Maio de 2007;
- d) Cabinda [Hospital Central – (Serviço de Pediatria) e Centro de Saúde Povo Grande] - seleccionámos 27 doentes, em Abril e Maio de 2008;
- e) Huambo [Hospital Central do Huambo - (Serviço de Pediatria e Medicina)] - seleccionámos 7 doentes em Abril e Maio de 2009;
- f) Cuanza Norte [Hospital Central de N'Dalatando - (Serviço de Pediatria e Medicina)] - foram seleccionados 27 doentes, em Maio de 2010;
- g) Malange [Hospital Central de Malange - (Serviço de Pediatria e Medicina)] e município de Kalandula (Posto de Saúde) - seleccionámos 23 doentes, em Maio de 2010.

Tabela III.1.4- Resumo da colheita de material biológico nas diferentes localidades

Província	Município - Local de colheita	Data de colheita	Estudo exploratório	Doentes
<b>Bengo</b>	Funda-Muculo	Maio 2007	218	*****
	Funda-Centro de Saúde Funda	Maio 2007	*****	8
<b>Cabinda</b>	Cabinda-Hospital Central, Centro Saúde Povo Grande	Abril, Maio 2008	*****	27
<b>Cuanza Norte</b>	N'Dalatando-Hospital Central	Maio 2010	*****	27
<b>Cuanza Sul</b>	Sumbe-Bairros Praia e Kissala	Julho 2006	374	*****
	Amboim-Gabela	Julho 2006	218	*****
	Porto Amboim-Bairro Kazua	Julho 2006	215	
	Sumbe-Hospital Central	Julho 2006	*****	33
<b>Huambo</b>	Huambo-Hospital Central	Abril, Maio 2009	****	7
	Mineira – Posto Médico		173	
<b>Luanda</b>	Rangel - Hospital Américo Maianga - Clínicas Privadas	2006 a 2010	*****	93
<b>Malange</b>	Malange - Hospital Central	Maio 2010	*****	23
<b>Total de amostras biológicas</b>			1198	218

### III.5. Processamento Laboratorial

O DNA obtido foi utilizado para detecção da presença de variantes genéticas relacionadas com os eritrócitos (drepanocitose – análise do gene *HBB*, deficiência G6PD – análise do gene *G6PD*, antígeno Duffy-análise do gene *DARC*) e identificação das espécies de *Plasmodium* presentes, através de nested-PCR mediante a amplificação dos genes que codificam a subunidade menor do RNA ribossomal, de acordo com o protocolo descrito por Snounou *et al.*, (1993).

#### III.5.1. Polimorfismos dos Eritrócitos

##### a) Metodologia (*HBB*)

A detecção da mutação CD6A> T foi feita através de uma adaptação do protocolo de bi-ASA-PCR (“*bidirectional single tube allele-specific amplification*”) descrito por Waterfall & Cobb (2001), utilizado como técnica de rotina no Centro de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (Lisboa, Portugal) para o diagnóstico pré e pós-natal da drepanocitose.

Nos indivíduos normais, homozigóticos para o alelo *HbA* (*HbAA*), ocorre a amplificação de um fragmento de 517pb, nos heterozigóticos (*HbAS*) ocorre a amplificação de duas bandas de 267pb e 517pb e para os homozigóticos para o alelo *HbS* (*HbSS*), somente a amplificação de um fragmento com 267pb; em todos ocorre a amplificação de um fragmento com 800pb, resultante do par de primers WT-CP517/MUT-CP267, e que funciona como controlo interno da reacção. A Figura III.1.2 ilustra o padrão dos resultados obtidos com a identificação dos genótipos por amostra.

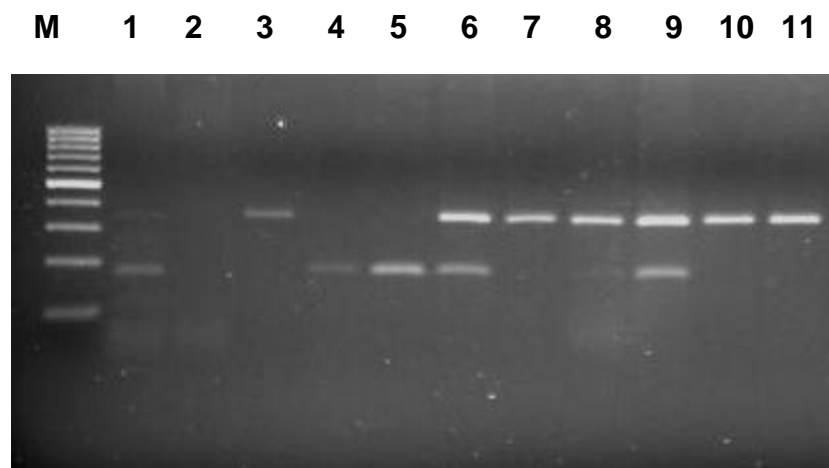


Figura III.1.2 - Exemplo dos produtos de PCR obtidos pela técnica ASA – *bidireccional* descrita por Waterfall & Cobb (2001)

M – marcador de peso molecular de 100bp;  
 poço 1: controlo positivo heterozigótico (AS);  
 poço 2: controlo negativo;  
 poços 3, 7, 8, 10 e 11: amostras sem mutação (AA);  
 poços 4 e 5: amostras homozigóticas (SS) e  
 poços 6 e 9: amostras heterozigóticas (AS).

#### b) Metodologia (*G6PD*)

A distinção dos alelos da *G6PD* foi efectuada por PCR-RFLP segundo o protocolo descrito por Tishkoff *et al.*, (2001): amplificação dos exões 5 e 3-4, seguida de análise dos polimorfismos de tamanho dos fragmentos originados pela restrição por *FokI* (*New England Biolabs*), na posição 376 do exão 5 e *NlaIII* (*New England Biolabs*), na posição 202 do exão 4. Os fragmentos foram separados por electroforese em gel de agarose 2% e visualizados após coloração com brometo de etídio.

Os alelos que não apresentaram nenhum dos sítios de restrição foram classificados como *G6PDB*, os que não apresentam o sítio *NlaIII*, mas apenas o *FokI* foram classificados como *G6PDA* e os que apresentaram ambos foram classificados como *G6PDA*<sup>-</sup>.

Como o gene *G6PD* está localizado no cromossoma X, nove genótipos distintos podem ser encontrados. Para a pesquisa das mutações no gene *G6PD* a técnica foi optimizada com controlos para cada genótipo, procedendo-se a sucessivas alterações no

protocolo. As Figuras III.1.3 a III.1.5 ilustram o padrão dos resultados obtidos com a identificação dos genótipos por amostra.

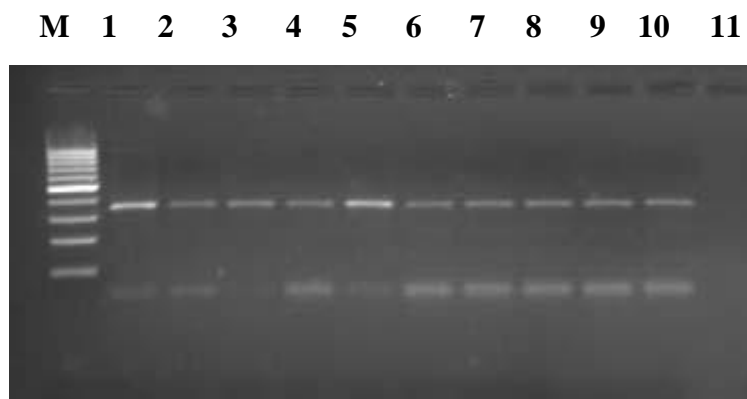


Figura III.1.3.- Exemplo de produtos amplificados obtidos por *PCR* para detecção do genótipo da G6PD, utilizando os primers descritos por Tishkoff *et al.* (2001).

**Produtos resultantes da amplificação do exão 5:** M – marcador de peso molecular de 100bp; poços 1 – 9: amostras amplificadas (342bp);

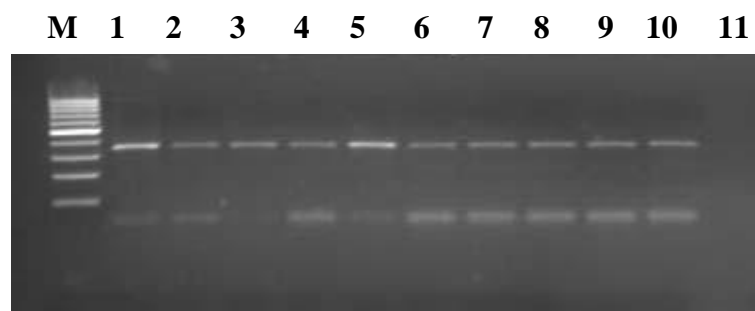


Figura III.1.4.- Exemplo de produtos amplificados obtidos por *PCR* para detecção do genótipo da G6PD, utilizando os primers descritos por Tishkoff *et al.* (2001).

**Produtos resultantes da amplificação dos exões 3/4:**

M – marcador de peso molecular de 100bp;

poços 1 – 9: amostras amplificadas (320bp);

poço 10: controlo positivo e poço 11: controlo negativo



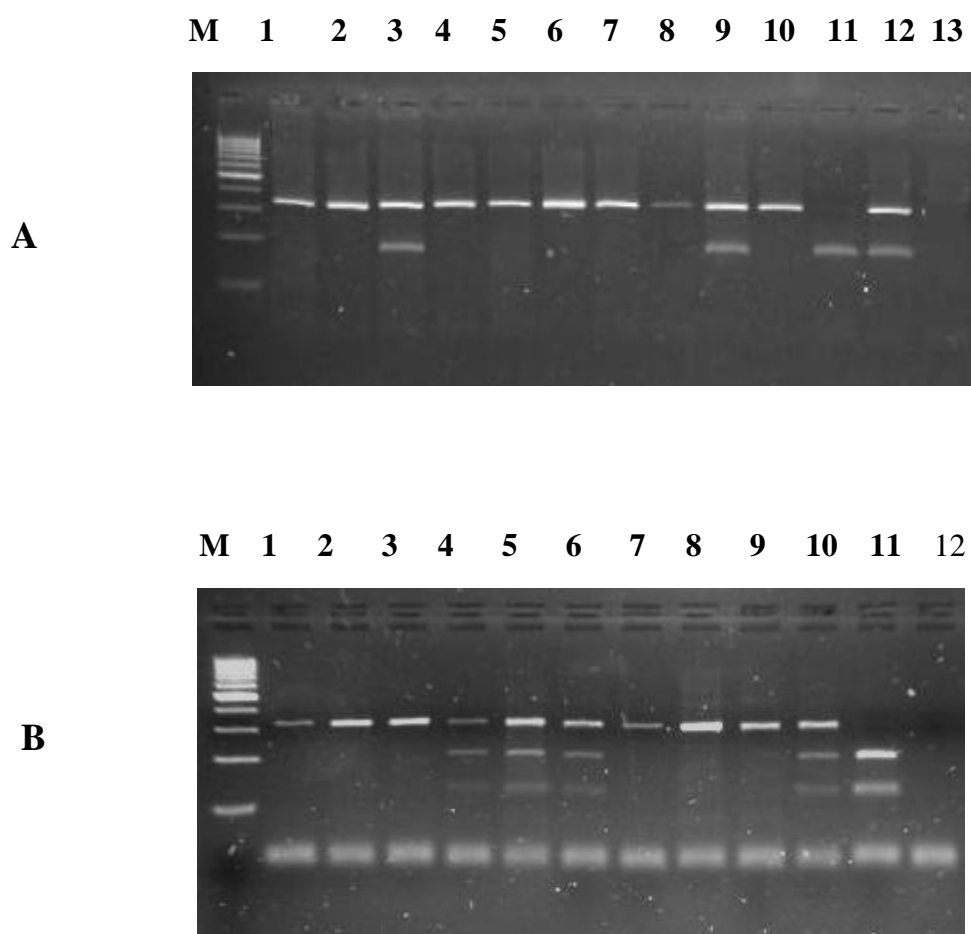


Figura III.1.5- Exemplo da restrição dos produtos amplificados, utilizando as endonucleases Fok I (exão 5) e Nla III (exões 3/4).

**A – Resultados da restrição dos produtos amplificados do exão 5:** M – marcador de peso molecular de 100bp; poços 1, 2, 4 – 8 e 10: amostras sem mutação (342bp); poços 3 e 9: amostras heterozigóticas [342bp, 173 e 169pb (não distinguíveis pois o tamanho é muito semelhante)]; poço 11: amostra homozigótica (173bp e 169bp); poço 12: controlo positivo heterozigótico e poço 13: controlo negativo

**B – Resultados da restrição dos produtos amplificados dos exões 3/4:** M – marcador de peso molecular de 100bp; poços 1 – 3 e 7 – 9: amostras sem mutação (320bp); poços 4 – 6 e 10: amostras heterozigóticas (320bp, 207 e 113pb); poço 11: controlo positivo homozigótico (207bp e 113bp) e poço 12: controlo negativo

### c) *Metodologia (Antigénio Duffy)*

Nos isolados de sangue nos quais se verificou a presença de *P.vivax* (quer em infecção simples, quer em infecção mista), procedeu-se à determinação do genótipo do hospedeiro humano relativo ao gene DARC. Para a detecção da mutação pontual -33T >

C, que corresponde ao fenótipo Duffy negativo, as regiões promotoras do gene DARC foram amplificadas por PCR, seguido de restrição enzimática com a endonuclease StyI (New England Biolabs, Ipswich, MA), adaptado de Le Van Kim (1995).

Resumidamente, a PCR foi realizada utilizando os primers P38 5'-AGGCTTGTGCAGGCAGTG - 3' e P39 5'-GGCATAGGGATAAGGGACT - 3', 0.5 pmol/μl de cada um, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 200μM de dNTP's e 1 U/μL de Taq DNA polimerase (Promega), num volume total de 30 μL. As condições de amplificação utilizadas nas reacções de PCR foram as seguintes: 94°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 59°C durante 1 minuto e 72°C durante 30 segundos, com uma extensão final a 72°C durante 10 minutos.

A endonuclease StyI foi utilizada para análise de restrição RFLP de produtos de PCR, de acordo com as especificações do fornecedor (New England Biolabs, Ipswich, MA). Fragmentos de restrição foram separados em gel 18% de acrilamida/bis-acrilamida (39,5:1) e corados com nitrato de prata.

Para confirmação, algumas amostras foram purificadas com o Kit SureClean (Bioline) de acordo com as recomendações do fabricante e foram sequenciadas em ambas as direcções pela Macrogen (Korea).

### III.5.2. Detecção e Identificação das Espécies de *Plasmodium*

A identificação das espécies de *Plasmodium sp.* foi realizada através da amplificação do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal por *nested-PCR*, segundo a técnica descrita por Snounou *et al.* (1993). Os produtos amplificados foram analisados através de electroforese em gel de agarose (2%) e visualizados sob luz Ultravioleta (UV). (Figura III.1.6).

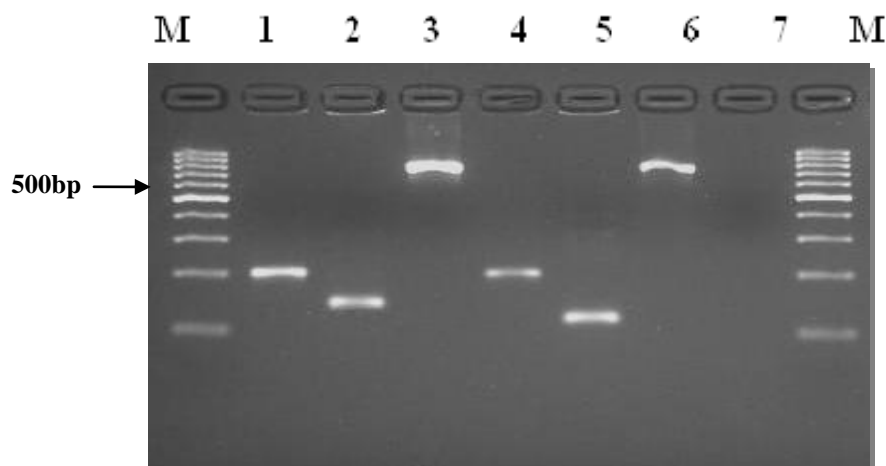


Figura III.1.6- Figura representativa do produto amplificado das quatro espécies de *Plasmodium*, utilizando os primers descritos por Snounou *et al.* (1993).

M – marcador de peso molecular de 100bp (Fermentas);

poços 1 e 4: amostras positivas para *P. falciparum* (205bp);

poço 2: amostra positiva para *P. malariae* (144bp);

poços 3 e 6: amostras positivas para *P. ovale* (800bp);

poço 5: amostra positiva para *P. vivax* (120bp) e poço 7: controlo negativo

### III.6. ASPECTOS ÉTICOS

Todos os pacientes ou os seus representantes legais receberam uma explicação verbal sobre os objectivos, métodos, benefícios e eventuais desconfortos que envolvia a participação activa e voluntária na investigação. As amostras de sangue periférico foram obtidas após consentimento livre e informado dos pacientes ou dos seus representantes legais. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comité de Ética do Ministério da Saúde da República de Angola e pelo CMDT/IHMT/UNL.

### III.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

#### III.7.1. Organização e Caracterização dos Dados

Os dados obtidos foram organizados numa base de dados, inicialmente, no programa Excel<sup>®</sup> (Microsoft) e posteriormente convertida em dois ficheiros diferentes, um para o estudo exploratório e outro para o estudo caso-controlo. Para o processamento dos dados utilizamos o programa estatístico IBM SPSS Statistics 19.

A análise descritiva dos dados, representados em tabelas de frequência simples ou de contingência, foi realizada através do programa estatístico IBM SPSS Statistics 19.

Um nível de significância ( $\alpha$ ) de 0,05 (erro admitido, acima do qual é excessiva a probabilidade de rejeitar a hipótese nula, sendo ela verdadeira, para um dado intervalo de confiança) (Holm, 1979; Koch & Gansky, 1996) foi considerado em todos os testes efectuados. Segundo Holm (1979), em testes múltiplos o valor de  $\alpha$  deve ser corrigido pelo método sequencial de Bonferroni, de modo a evitarem-se erros de falsa rejeição (i.e. tipo 1) ou seja rejeitar a hipótese nula quando ela é verdadeira. No caso de amostras pequenas ou com uma distribuição não normal deve ser feita uma reamostragem.

No nosso estudo (por exemplo o grupo de doentes com malária grave e malária não complicada), foi feita uma reamostragem, transformando-se os dois grupos num só grupo: “doentes com malária”.

#### ***Tamanho efectivo populacional ( $N_e$ )***

Waples (1991) (*in* Dimmick *et al.*, 2001) sugere, para avaliação dos factores ecológicos e genéticos de uma determinada população, três pressupostos: 1) Saber se a população é geneticamente distinta de outras espécies populacionais; 2) Saber se a população a investigar ocupa usual ou indistintamente o mesmo habitat; 3) Saber se a população mostra evidência de adaptação comum ou distinta do meio ambiente. Segundo Waples (1991) o tamanho efectivo populacional representa a população teoricamente ideal, que experimenta alterações genéticas na mesma proporção que a

população em estudo, sendo essas alterações consequência da grandeza da deriva genética e por conseguinte um estimador do grau de efeito da deriva na variação das frequências alélicas. Assim, quanto menor o  $N_e$  maior a variação da frequência alélica entre as gerações e a taxa de fixação ou perda aleatória dos alelos.

### ***Testes e tabelas de contingência 2x2***

Para medir o grau de associação linear entre as variáveis categóricas correspondentes às linhas e às colunas, ou seja para determinar se a distribuição dos indivíduos entre categorias de uma variável é independente da distribuição dos indivíduos nas categorias de outra variável [Hipótese nula], numa análise de uma tabela de contingência utilizou-se o *teste exacto de Fisher* (mais adequado por fornecer sempre no teste binominal o valor exacto de p – ver abaixo), como alternativa ao teste de Chi-quadrado (sempre que as condições de aplicabilidade deste teste não foram satisfeitas, devido à reduzida dimensão da nossa amostra e apresentar números esperados na tabela menores de cinco) (Murteira *et al.*, 2002). No caso de a tabela possuir apenas duas linhas e duas colunas (2x2) é equivalente a uma comparação de proporções, por exemplo (associação entre o genótipo HbAS, HbAA e os grupos de estudo (doentes e infectados assintomáticos) que, segundo Kirkwood, pode ser calculada pela seguinte fórmula.

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

Para cada célula da tabela, (O) é a frequência observada e (E) é a frequência esperada. Quanto maior a diferença entre as frequências observada e esperada, maior o valor do  $\chi^2$  calculado, menos provável é que a diferença seja devida ao acaso. Assim, o valor de  $\chi^2$  determinado é comparado com os valores críticos da distribuição teórica do  $\chi^2_{\alpha(gl)}$  para uma determinada significância  $\alpha$  e n graus de liberdade (gl). Para uma tabela 2x2 o número de grau de liberdade será 1. Quando o tamanho total da amostra é pequeno (menor que 20) ou quando numa das células da tabela 2x2 a frequência esperada é inferior a 5, ou seja o total seja inferior a 20, o teste de  $\chi^2$  deve ser

substituído pelo *teste exacto de Fisher*, que calcula a probabilidade exacta da tabela observada e de todas as possíveis tabelas que resultam do acaso, com os mesmos valores marginais das linhas e colunas. A análise dos resíduos (*i*) permitiu a identificação de erros (i.e. das variáveis não observáveis) (Cunha *et al.*, 2007).

### ***Teste de hipótese***

O objectivo do teste de hipótese foi o de decidir com base na informação fornecida pelos dados, sobre a aceitação ou não aceitação de determinada hipótese. Sendo  $\chi$  uma variável aleatória com função de probabilidade  $f(\chi|\theta)$  em que  $\theta$  é um parâmetro desconhecido com espaço-parâmetro dado por  $\Theta$ . Qualquer hipótese - conjectura sobre  $\theta$  - estabelece no espaço-parâmetro  $\Theta$  uma partição.

$$\theta \cup \theta_1 = \theta, \theta_0 \cap \theta_1 = \emptyset$$

Onde  $H_0: \theta \in \theta_0$  é a hipótese a testar, e  $H_1: \theta \in \theta_1$ , é a hipótese que corresponde ao conjunto das alternativas. À hipótese  $H_0$  dá-se o nome de hipótese nula, designação que corresponde ao *status quo* e hipótese e a  $H_1$  é designada como hipótese alternativa (Murteira *et al.*, 2002).

### ***Valor - P***

Segundo Murteira (2002), considera-se valor-p ou nível de significância associado ao valor observado da estatística-teste a probabilidade  $p_{obs}$ , de obter este valor ou outro mais desfavorável para a hipótese nula, admitindo que esta hipótese é verdadeira (Murteira *et al.*, 2002). Ao realizarmos o teste de hipótese uma vez fixada a respectiva dimensão, o resultado consistiu em rejeitar a  $H_0$  se a amostra observada pertencia à região crítica (ou se o valor observado pertencia à região crítica definida no respectivo domínio). Ao reportarmos a conclusão do teste, tudo se resume em afirmar se a hipótese nula é aceite ou rejeitada. Ao procedermos desse modo não tivemos em conta

se a amostra observada estava muito ou pouco distante da fronteira da região crítica ou se o valor observado da estatística-teste se situava longe ou perto do limiar de rejeição. Ao passarmos da  $H_0$  para  $H_1$ , há sempre perda de informação sobretudo quando a variável é contínua e o teste se refere a probabilidades. Para minorar a perda de informação procura-se definir o maior número possível de classe, com uma frequência esperada superior ou igual a cinco.

### ***Intervalo de Confiança***

Ao proceder-se à estimação por intervalos, propôs-se um certo intervalo  $(t_1, t_2)$ , para significar que o verdadeiro valor do parâmetro está muito provavelmente entre o  $t_1$  e  $t_2$ . Ao associar um intervalo à estimativa proposta atribui-se ao mesmo intervalo um grau ou coeficiente de confiança. Para medida desse intervalo de confiança (IC) toma-se a probabilidade do intervalo aleatório que lhe está associado de modo a conter  $\mu$ , ou seja 0,95. Diz-se então que o determinado intervalo  $(X - *, X + *)$  constitui o intervalo de confiança a 95% (IC 95%) (Murteira *et al.*, 2002).

### ***Intervalo de Confiança para a proporção $p$ .***

Definiu-se IC para a proporção como sendo a razão entre o total de resultados pelos quais estavam em conformidade com uma condição pré-estabelecida e o total de resultados existentes, sendo chamada de frequência relativa, que pode ser transformada em percentagem bastando multiplicar o seu resultado por 100 %. Para ser avaliada uma proporção é necessário que se tenha uma amostra suficientemente grande de modo a ser criado o IC de  $p$ , a partir directamente da distribuição normal.

### ***Cálculo do Intervalo de Confiança de $p$ (95%IC)***

O facto de a variável aleatória ter uma distribuição conhecida independente do parâmetro a estimar  $p$ , permitiu calcular a probabilidade de  $Z$ , assumindo um valor compreendido entre dois números reais. Para calcularmos o intervalo de confiança das

frequências obtidas, utilizamos resultado das frequências  $P_1$  e  $P_2$  e substituímo-los na fórmula do intervalo da média cuja variância é conhecida.

$$\hat{p} - Z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}} \quad \hat{p} + Z_{1-\frac{\alpha}{2}} \sqrt{\frac{\hat{p}(1-\hat{p})}{n}}$$

### ***Calculo dos odds ratio e risco relativo***

A abordagem geral para determinar o risco dos indivíduos com um determinado genótipo em contrair uma doença, em relação ao resto da população, consiste em calcular o risco relativo (RR), onde  $f_c$  e  $f_d$  são as frequências do genótipo em grupos controlo e dos doentes, respectivamente (Cunha *et al.*, 2007). Se um genótipo reduz a susceptibilidade a uma doença, então a frequência de genótipo em indivíduos com a doença é inferior ao grupo controlo, ou seja  $RR < 1$ . Ao contrário, se o genótipo aumenta a susceptibilidade à doença, então a frequência do genótipo no grupo de doentes é maior do que no grupo controlo e  $RR > 1$ . A fim de se utilizar os valores para os diferentes genótipos RR na genética da população, aqueles deverão ser traduzidos em aptidões relativas para os diferentes genótipos. Hill (1991) (*in* Hedrick, 2004) sugeriu que o efeito selectivo para os indivíduos com um determinado genótipo que confere resistência à malária poderia ser calculado segundo a seguinte fórmula:

$$S = m(1 - RR)$$

Onde  $m$  é a taxa de mortalidade dos indivíduos infectados com malária independente do genótipo.

O *odds ratio* (OR) que se pode traduzir como “razão de possibilidades” ou “razão de probabilidades” é definido como a probabilidade de ocorrência de um evento dividida pela probabilidade da não ocorrência do mesmo evento. É uma aproximação estimada do RR, utilizada em estudos de caso-controlo (onde o RR não pode ser calculado). (Hedrick, 2011). O cálculo do *odds ratio* (que é o método de comparação das frequências de exposição entre casos e controlo) permite obter uma medida de



associação que é conceptualmente semelhante ao risco relativo. É calculado segundo a seguinte fórmula:

	Grupo A	Grupo B
Sucesso	A	B
Não sucesso	C	D

$$OR = \frac{\frac{A}{C}}{\frac{B}{D}}$$

O OR e o seu intervalo de confiança interpretam-se do mesmo modo que o RR. No caso de se tratar do cálculo do OR a partir de dados de uma tabela de frequência (2x2), pode-se utilizar a seguinte fórmula:

$$OR = \frac{a \times d}{b \times c}$$

No nosso estudo utilizamos como recurso o *software* do programa estatístico IBM SPSS Statistics 19, para o cálculo do OR (Cunha *et al.*, 2007).

### III.7.2. Estimativas de Variabilidade Genética

Sabe-se que a investigação da variabilidade genética das populações pode ser realizada de modo distinto de acordo com os diferentes caracteres a analisar e segundo a metodologia a utilizar pode integrar dois tipos de estudos: 1) Genética quantitativa (Falconer, 1993), que identifica os caracteres que não seguem os padrões mendelianos de heritabilidade para um só *locus* (i.e. não existe correspondência directa entre o fenótipo e o genótipo); ou 2) Estudos de genética qualitativa, que analisa caracteres descontínuos, tendo como exemplo o estudo dos polimorfismos enzimáticos que apresentam grandes vantagens nos estudos de genética de populações permitindo estabelecer os genótipos para determinados *loci* e a partir destes estimar parâmetros genéticos de populações como frequências genotípicas, alélicas, heterozigotia e polimorfismo. No nosso estudo foram calculadas as frequências alélicas e genotípicas.

**a). Cálculo da frequência alélica**

A frequência alélica é a contagem directa dos alelos encontrados numa amostra com  $N$  indivíduos (ou  $2N$  cromossomas). Pode ser calculada a partir do *número observado de diferentes genótipos* num dado *locus* ou a partir das *frequências genotípicas*. Se a frequência alélica for calculada a partir do número de genótipos, contam-se o número de alelos de um dado tipo num dado *locus* e divide-se pelo número total de alelos da população. Enquanto os indivíduos homozigóticos possuem duas cópias de um mesmo alelo, os indivíduos heterozigóticos possuem uma cópia de alelos diferentes. Sendo  $p$  a frequência do alelo  $A$  [ $f(A)$ ] e  $q$  a frequência do alelo  $a$ , o cálculo da frequência alélica é dado segundo a fórmula:

$$p = f(A) = \frac{(2 \times \text{número de homozigóticos}) + (\text{número de heterozigóticos})}{(2 \times \text{número total de indivíduos})}$$

**a.1. Cálculo da frequência alélica: gene HBB**

$$f(A) = \frac{(2 \text{ AA}) + (1 \text{ AS})}{2N}$$

$$f(S) = \frac{(2 \text{ SS}) + (1 \text{ AS})}{2N}$$

$$f(A) + f(S) = 1,0$$

*b.1. Cálculo da frequência alélica: gene G6PD*

$$f(B) = \frac{(2BB) + (1BA) + (1BA') + (1B)}{[2N \text{ (mulheres)} + N \text{ (homens)}]}$$

$$f(A) = \frac{(2AA) + (1BA) + (1AA') + (1A)}{[2N \text{ (mulheres)} + N \text{ (homens)}]}$$

$$f(A') = \frac{(2A'A') + (1BA') + (1AA') + (1A')}{[2N \text{ (mulheres)} + N \text{ (homens)}]}$$

$$f(B) + f(A) + f(A') = 1,0$$

Se a frequência alélica for calculada a partir das frequências genóticas, procede-se do seguinte modo: estando representada a frequência de um genótipo  $A_i A_j$  por  $X_{ij}$ , a frequência do alelo  $i$  é dada por:

$$\chi_i = \frac{2\chi_{ij} + \sum_{j \neq i} \chi_{ij}}{2N}$$

Onde  $\sum_{j \neq i} \chi_{ij}$  representa o somatório dos  $X_{ij}$  i.e. a frequência de todos os genótipos que apresentam o alelo  $i$  e  $N$  o número de indivíduos.

### III.7.3. Apresentação dos Resultados

Para apresentação em versão electrónica e papel, o texto foi digitado em ambiente Windows (Microsoft Word 2010) e a apresentação gráfica dos dados foi trabalhada no programa estatístico IBM SPSS Statistics 19 e Microsoft Excel 2010.



# CAPÍTULO. 4

---

## RESULTADOS



## IV. RESULTADOS

### IV.1. Dados do Estudo Exploratório

#### *Prevalência de infecção*

Durante os meses de Julho de 2006, Maio de 2007 e Abril/Maio de 2009, foram recolhidas um total de 1.198 amostras de sangue periférico de crianças com mais de seis meses e adultos até aos 67 anos, em três províncias do país, com transmissão mesoendémica estável: Cuanza Sul: 807 (67,4%), Bengo: 218 (18,2%) e Huambo 173 (14,4%), integrando sete municípios (Porto Amboim, Sumbe, Amboim, Funda, Muculo, Huambo-Sede e Mineira) (Tabela IV.1.1). Seiscentas e quarenta e oito (54,1%) eram do sexo feminino e 550 (45,9 %) do sexo masculino, com a seguinte distribuição etária: 1.035 (86,4%) menores de cinco anos, 75 (6,3%) tinham entre seis e catorze anos e 88 (7,3%) eram maiores de 15 anos. A média de idade foi de 5,1 anos; a mediana e a moda foram de dois anos. A prevalência total da infecção por *Plasmodium sp.* identificada por PCR, foi de 23,5% (281), sendo *P. falciparum* a espécie com maior prevalência, ocorrendo em 98,2% dos infectados, seguida de *P. malariae* com 10,7 %, *P. ovale* com 4,6% e *P. vivax* com 2,5%. A mais alta prevalência de infecção foi observada no município do Amboim-província do Cuanza Sul (54,6%) e a mais baixa no município do Huambo-Sede (2,7%). A análise dos dados revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os diferentes municípios e a ocorrência de infecção ( $p < 0,001$ ), embora o IC 95% tenha demonstrado um valor negativo em relação ao município Mineira da província do Huambo, valor considerado desprezível na nossa análise (Tabela IV.1.1 e IV.1.2).

Tabela IV.1.1. Prevalência de infecção por *Plasmodium sp.* nos sete municípios de acordo com o período de colheita das amostras

		Período de colheita da amostra	População estudada		Prevalência Infecção <i>Plasmodium sp.</i>		IC 95%
Província	Municípios		n	%	+	%	
Cuanza-Sul	Porto Amboim	Jul-06	215	17,9	63	29,3	0,232-0,354
	Sumbe		374	31,2	56	15,0	0,114-0,186
	Amboim		218	18,2	119	54,6	0,480-0,612
Bengo	Funda	Mai-07	54	4,5	15	27,8	0,159-0,397
	Muculo		164	13,7	22	13,4	0,082-0,186
Huambo	Mineira	Abr.Mai-09	23	1,9	2	8,7	(-0,028- 0,202)*
	Huambo-Sede		150	12,5	4	2,7	0,001-0,053
Total			1.198	100	281		

Legenda- (\*) valor considerado desprezível, pela probabilidade de o intervalo encontrado não conter a prevalência observada.

Tabela IV.1.2. Prevalência (%) de infecções simples e mistas por *Plasmodium sp.* nas três províncias de Angola (Cuanza Sul, Bengo e Huambo)

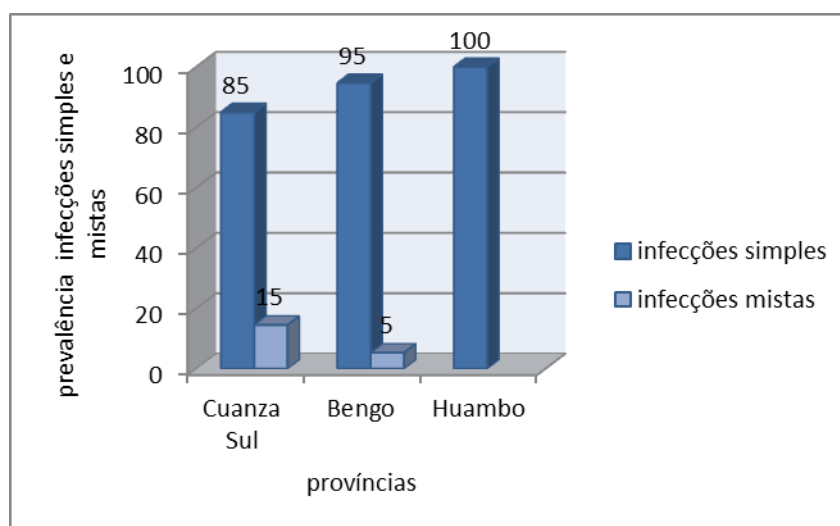
Províncias		Cuanza Sul	Bengo	Huambo	TOTAIS 1 198	
		(n=807)	(n=218)	(n=173)	n	%
Total de infectados		238	37	6	281	23,5
%		29,5	17,0	3,5		
Infecções simples	F	83,2	92,1	100	238	84,7
	M	0,8	0,0	0,0	2	0,7
	O	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	V	0,8	2,7	0,0	3	1,1
	Total	84,9	94,6	100	243	86,5
Infecções mistas	F + M	8,8	0,0	0,0	21	7,5
	F + O	2,1	5,4	0,0	7	2,5
	F + V	1,3	0,0	0,0	3	1,1
	F + M + O	2,5	0,0	0,0	6	2,1
	F + M + V	0,4	0,0	0,0	1	0,4
Total		15,1	5,4	0,0	44	15,7
Total de F		98,3	97,3	100	276	98,2
Total de M		12,6	0,0	0,0	30	10,7
Total de O		4,6	5,4	0,0	13	4,6
Total de V		2,5	2,7	0,0	7	2,5

**Legenda:** F - *P. falciparum*; O - *P. ovale*; V - *P. vivax*; M - *P. malariae*; F+M - *P. falciparum*+*P. malariae*; F+V - *P. falciparum* + *P. vivax*; F+O - *P. falciparum* + *P. ovale*; F+M+O - *P. falciparum* + *P. malariae* + *P. ovale*; F+M+V - *P. falciparum* + *P. malariae* + *P. vivax*.



Do total de infectados (281) entre as infecções simples, *P. falciparum* foi a espécie predominante com 84,7% (238). A ocorrência das espécies não *falciparum* nos isolados foi de 1,8% (*P. malariae* e *P. vivax*). Não foi observado *P. ovale* em infecções simples, tendo esta espécie sido identificada neste estudo em co-ocorrência com outras espécies (*P. falciparum* e *P. malariae*) e não isoladamente. Em relação às infecções mistas, os nossos resultados demonstraram uma prevalência de 15,7% de co-infecções duplas e triplas. A distribuição das infecções por *Plasmodium sp.* e da co-ocorrência das espécies, nas três províncias do país durante os diferentes períodos de observação, foi a seguinte: na província do Cuanza Sul obtivemos uma frequência de 85% de infecções simples e 15% de infecções mistas (*P. falciparum* + *P. malariae*); (*P. falciparum* + *P. vivax*); (*P. falciparum* + *P. ovale*); (*P. falciparum* + *P. malariae* + *P. ovale*); (*P. falciparum* + *P. malariae* + *P. vivax*); na província do Bengo a frequência de infecções simples *P. falciparum* e *P. vivax* foi de 95%, com 5% de infecções mistas (co-infecção *P. falciparum* + *P. ovale*). Relativamente à província do Huambo os nossos resultados demonstraram 100% de infecção por *P. falciparum* (Tabela IV.1.2 e Figura IV.1.1). Foram encontradas diferenças significativas ( $p < 0,001$ ) para uma ( $E$ ) de 0,04, entre a frequência das infecções (simples e mistas) e os municípios.

Figura IV.1.1. Totais (%) de infecções simples e mistas por *Plasmodium sp.* por província estudada



Nos três municípios estudados da província do Cuanza Sul (Amboim, Porto Amboim e Sumbe), foram identificados por PCR duas a três (*P. falciparum* + *P. malariae*) ou (*P. falciparum* + *P. vivax*) ou (*P. falciparum* + *P. malariae* + *P. ovale*) das quatro espécies de *Plasmodium* estudadas, apesar de a microscopia óptica (dados não apresentados) ter demonstrado apenas infecções por *P. falciparum* em todas as localidades onde realizámos a nossa pesquisa. A distribuição das quatro espécies não foi uniforme (Figura IV.1.2 e Tabela IV.1.3). No Sumbe não foram identificadas infecções por *P. vivax*, enquanto em Porto Amboim não foram identificadas infecções por *P. malariae*. A prevalência das infecções mistas nestes municípios foi respectivamente de 3,6% e 4,8%. No município do Amboim obtivemos uma taxa de prevalência de infecção plasmódica de 54,6% e de infecções mistas de 26,1%, tendo sido estas as maiores taxas encontradas durante o estudo, quer em relação aos municípios da mesma província, como aos de outras localidades. Neste município as co-infecções duplas mais predominantes foram: (*P. falciparum* + *P. malariae*) 16,8 % e (*P. falciparum* + *P. ovale*) 2,5%. Quanto às co-infecções triplas foram identificadas: (*P. falciparum* + *P. malariae* + *P. ovale*) com 5,0% e (*P. falciparum* + *P. malariae* + *P. vivax*) com 0,8 %. *Plasmodium vivax* só foi identificado em infecções múltiplas (duplas e triplas) não tendo sido isolado nas infecções simples. A análise da distribuição das infecções (simples e mistas) nos três municípios da província do Cuanza Sul revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ). Este resultado deve-se essencialmente ao elevado número de infecções mistas no município do Amboim e ao reduzido número destas infecções nos outros dois municípios, conforme se pode observar nos dados apresentados na Tabela IV.1.3.

Figura IV.1.2. Prevalência (%) de infecções simples e mistas por *Plasmodium sp.* nos três municípios da província do Cuanza Sul

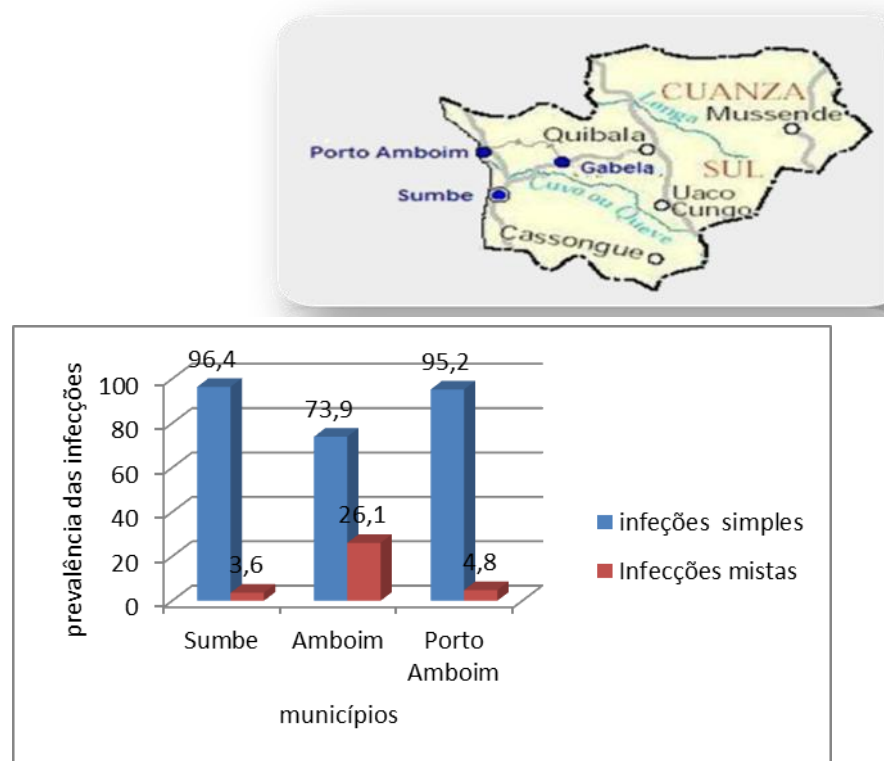


Tabela IV.1.3. Distribuição de (*O*) de infecção por *Plasmodium sp.* nos municípios da província do Cuanza Sul

Municípios		Infecção por <i>Plasmodium sp.</i>			Total
		<i>P. falciparum</i>	Infecções mistas	<i>P. malariae e P. vivax</i>	
Porto Amboim	(0)	58	3	2	63
	V. Residual	0,8	-2,1	0,9	
Sumbe	(0)	53	2	1	56
	V. Residual	0,9	-2,2	0,1	
Amboim	(0)	87	31	1	119
	V. Residual	-1,2	3,1*	-0,7	
Total		198	36	4	238

A frequência da infecção por *Plasmodium sp.* variou em função dos diferentes grupos etários: menores de cinco anos, obtivemos uma prevalência de infecção global de 91,3%, com predomínio de *P. falciparum* (77,0%). A prevalência das infecções

mistas neste grupo foi de 13,2%, destacando-se a co-infecção dupla (*P. falciparum* + *P. malariae*) com 8,2% (Figura IV.1.4). Nos restantes grupos verificamos taxas de infecção plasmódica relativamente mais baixas, 7,5% e 1,4%, respectivamente no grupo etário dos 6-14 anos e nos maiores de 15 anos (Figura IV.1.3 e Tabela IV.1.4).

Figura IV.1.3. Prevalência (%) de infecção por *Plasmodium sp.* de acordo com os grupos etários

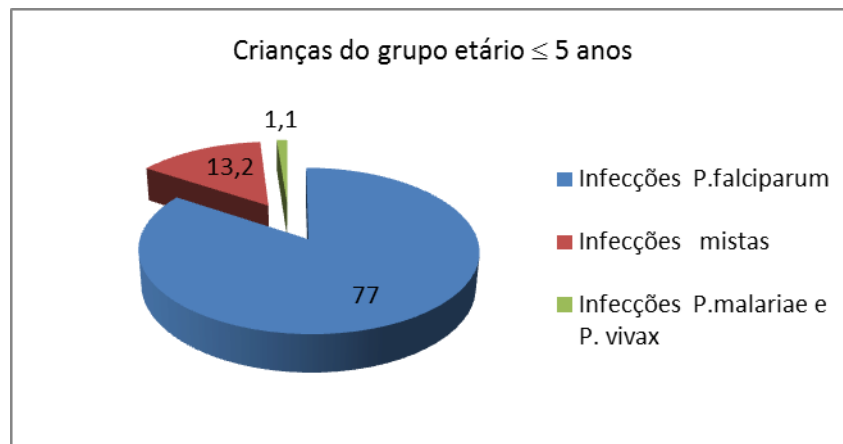


Tabela IV.1.4. Distribuição de frequências de infecção simples e mista por total de infectados em cada grupo etário

Grupo etário	Total de infectados	Tipos de infecção (%)		
		<i>P. falciparum</i>	Infecção mista	<i>P. malariae</i> e <i>P. vivax</i>
≤ 5 anos	256	(216) 77,0	(37) 13,2	(3) 1,1
6-14 anos	21	(18) 6,4	(1) 0,4	(2) 0,7
≥15 anos	4	(4) 1,4	0,0	0,0
Total	281	(238) 84,7	(38) 13,5	(5) 1,7

Nos indivíduos maiores de 15 anos, das quatro espécies estudadas apenas *P. falciparum* foi identificado em 100% dos isolados, não tendo sido observadas infecções por outras espécies de *Plasmodium*. As diferenças encontradas devem-se essencialmente ao elevado número de crianças infectadas do grupo etário menor de cinco anos e ao reduzido número de infecções, quer simples quer mistas, nos restantes dois grupos etários (Tabela IV.1.4).

Figura IV.1.4. Distribuição (%) de infecção por *Plasmodium sp.* em crianças do grupo etário  $\leq$  de 5 anos



### Frequência do gene *HBB*

Em relação ao gene *HBB*, do total de amostras processadas (1.198) obtivemos um sucesso de amplificação de 78,4 % (939) das mesmas. A prevalência global dos três genótipos foi a seguinte: *HbAA* 69,3% (651), *HbAS* 27,3% (256) e 3,4% (32) *HbSS*, a frequência do alelo *HbA*  $f(A)$  foi de 0,83 enquanto a do alelo *HbS*  $f(S)$  foi de 0,17. Em resumo, apresentam-se na Tabela IV.1.5., a frequência dos genótipos e dos alelos do gene *HBB* na população estudada das três províncias.

Tabela IV.1.5. Frequências genotípicas e alélicas do gene *HBB* nas três províncias

Genótipos	Cuanza Sul n=555	Bengo n=211	Huambo n=173
	%	%	%
<i>HbAA</i>	60,2	80,1	85,5
<i>HbAS</i>	34,8	18,5	13,9
<i>HbSS</i>	5,0	1,4	0,6
$f(A)$	0,78	0,89	0,92
$f(S)$	0,22	0,11	0,08

A análise da distribuição das frequências dos genótipos *HbAA*, *HbAS* e *HbSS*, pelos diferentes grupos etários, revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p < 0,001$ ), para um valor mínimo da ( $E$ ) de 2,42. Na Tabela IV.1.6 estão sumarizados os resultados das frequências observadas e dos resíduos, destacando-se os maiores resíduos no grupo etário  $\geq 15$  anos, devido ao baixo número de indivíduos com o genótipo *HbAS*, neste grupo.



Tabela IV.1.6. Frequências genotípicas do gene *HBB*, por grupos etários

Genótipos		Grupos Etários			Total
		$\leq 5$ anos	6-14anos	$\geq 15$ anos	
<b>HbAA</b>	(0)	518	58	75	651
	V. Residual	-1,0	1,3	1,8	
<b>HbAS</b>	(0)	233	11	12	256
	V. Residual	1,4	-1,9	-2,4	
<b>HbSS</b>	(0)	29	2	1	32
	V. Residual	0,5	-0,3	-1,2	
<b>Total</b>	(0)	780	71	88	939

### Frequência do gene *G6PD*

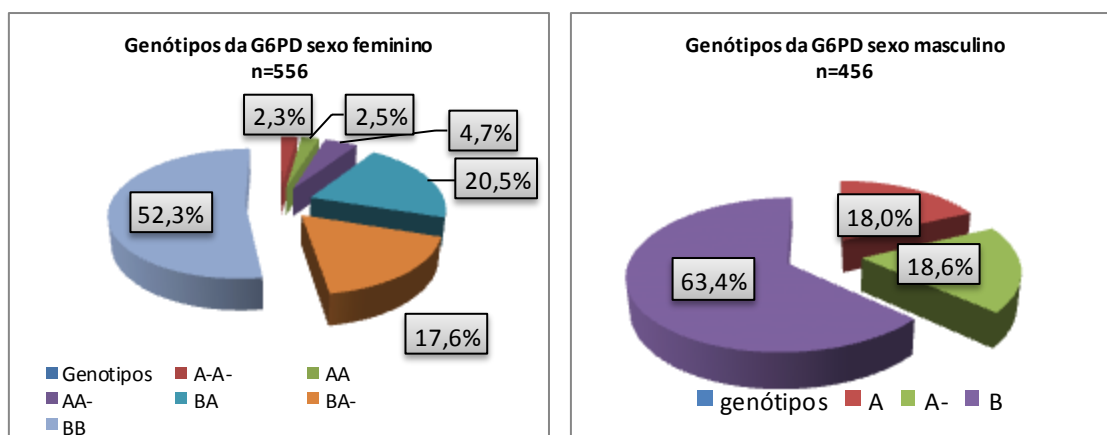
Em relação ao gene *G6PD*, das 1.198 amostras foi possível caracterizar 1.012 indivíduos (556 mulheres e 456 homens). Obtivemos um sucesso de amplificação de 84,5%. Relativamente ao polimorfismo trialélico da *G6PD*, foram identificados nove genótipos para ambos os sexos distribuídos conforme as Figuras (IV.1.5 e IV.1.6).

Figura IV.1.5. Frequências genotípicas e alélicas do gene *G6PD*, na população estudada

			Actividade Enzimática								
Normal		Deficiente		Normal			Intermédia		Deficiente		
G6PD <sup>+</sup>		G6PD <sup>-</sup>		G6PD <sup>+</sup>			G6PD <sup>+</sup>		G6PD <sup>-</sup>		
G6PDA	G6PDB	G6PDA <sup>-</sup>		G6PDAA	G6PDBA	G6PDBB	G6PDAA <sup>-</sup>	G6PDBA <sup>-</sup>	G6PDA <sup>-</sup> A <sup>-</sup>		
18,0% (82)	63, 4% (289)	18,6% (85)		2,5% (14)	20,5% (114)	52,3% (291)	4,7% (26)	17,6% (98)	2,3% (13).		
Frequências alélicas											
f(A)=0.16				f(B)=0.69				f(A <sup>-</sup> )=0.15			

A frequência alélica calculada para a população total estudada nas três províncias apresentou a seguinte distribuição:  $f(A) = 0,16$ ;  $f(B) = 0,69$ ;  $f(A^-) = 0,15$ . O alelo  $A^-$  foi encontrado nas três províncias (Cuanza Sul, Bengo e Huambo), com as seguintes frequências respectivamente:  $f(A^-) 0,15$ ;  $f(A^-) 0,10$ ;  $f(A^-) 0,20$ ; sendo mais frequente na província do Huambo, quando comparado com o Bengo onde não foram encontradas mulheres deficientes ( $G6PDA^-A^-$ ). A análise da distribuição da presumível actividade enzimática (normal, intermédia e deficiente) da *G6PD*, nas três províncias revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ), para um valor mínimo ( $E$ ) de 15,8.

Figura IV.1.6. Distribuição (%) dos genótipos da *G6PD*, encontrados na amostra, por sexo





Os genes *G6PD* foram agrupados segundo uma presumível actividade enzimática, tendo sido encontrados os seguintes resultados: 78,1% (790) dos indivíduos são  $G6PD^+$  com actividade enzimática normal, 12,3% (124) são  $G6PD^+$  (com actividade enzimática intermédia) e 9,7 % (98) são  $G6PD^-$  (deficientes). A análise da distribuição de frequências nos diferentes níveis de actividade enzimática por sexo revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ), para um valor mínimo ( $E$ ) de 44,1. Foram identificados 18,6% de homens deficientes ( $G6PDA^-$ ) e apenas 2,3% de mulheres deficientes ( $G6PDA^-A^-$ ). No grupo de indivíduos com actividade enzimática normal (homens 81,4%, mulheres 75,4%), a análise da ( $E$ ) e ( $i$ ) revelou, para um valor esperado de 434 para as mulheres e de 356 para os homens, um valor residual de (-7) e (8), respectivamente, significando o maior número de mulheres com actividade enzimática normal do que seria esperado. Quanto aos indivíduos do grupo  $G6PD^+$  (actividade

enzimática intermédia), verificada unicamente em mulheres, obtivemos uma frequência de 22,3%.



A caracterização dos 1.012 indivíduos para o gene *G6PD*, distribuídos pelas províncias do Cuanza Sul 67,2% (680), Bengo 16,6% (168) e Huambo 16,2% (164), demonstrou prevalências indicadas nas Figuras (IV.1.7 a IV.1.9). Assim, na província do Cuanza-Sul, foram amplificadas no total 680 amostras, das quais 359 pertenciam aos indivíduos do sexo feminino e 321 do masculino. Destas determinou-se o genótipo da *G6PD*, obtivemos um sucesso de amplificação de 84,2%. A distribuição de frequências alélicas e dos genótipos da *G6PD* pode ser observada na Figura IV.1.7.

Figura IV.1.7. Frequências genotípicas e alélicas do gene *G6PD*, na província do Cuanza Sul

			Actividade Enzimática								
Normal		Deficiente		Normal			Intermédia		Deficiente		
G6PD <sup>+</sup>		G6PD <sup>-</sup>		G6PD <sup>+</sup>			G6PD <sup>±</sup>		G6PD <sup>-</sup>		
G6PDA	G6PDB	G6PDA <sup>-</sup>		G6PDAA	G6PDBA	G6PDBB	G6PDAA <sup>-</sup>	G6PDBA <sup>-</sup>	G6PDA <sup>-</sup> A <sup>-</sup>		
52	207	62		7	72	198	16	54	12		
Frequências alélicas											
f(A)=0,15				f(B)=0,70				f(A <sup>-</sup> )=0,15			

Na província do Bengo, foram amplificadas no total 168 amostras, dos quais 94 mulheres e 74 homens. Destas determinou-se o genótipo da *G6PD*, com um sucesso de amplificação de 77,1%. Não foi encontrado o genótipo *G6PDA<sup>-</sup>A<sup>-</sup>* (mulheres deficientes). As frequências alélicas e do genótipo da *G6PD* observadas nesta província foram as seguintes (Figura IV.1.7).



Figura IV.1.8. Frequências genotípicas e alélicas do gene *G6PD* na província do Bengo

			Actividade Enzimática								
Normal		Deficiente	Normal			Intermédia		Deficiente			
<b>G6PD<sup>+</sup></b>		<b>G6PD<sup>-</sup></b>	<b>G6PD<sup>+</sup></b>			<b>G6PD<sup>±</sup></b>		<b>G6PD<sup>-</sup></b>			
G6PDA	G6PDB	<b>G6PDA<sup>-</sup></b>	G6PDAA	G6PDBA	G6PDBB	G6PDAA <sup>-</sup>	G6PDBA <sup>-</sup>	<b>G6PDA<sup>-</sup>A<sup>-</sup></b>			
16	54	4	4	16	51	2	21	<b>0</b>			
Frequências alélicas											
$f(A)=0,16$			$f(B)=0,74$			$f(A^{-})=0,10$					



Na província do Huambo, foram amplificadas no total 164 amostras, das quais 103 provinham de mulheres e 61 de homens. Destas, determinou-se o genótipo de G6PD, com um sucesso de amplificação de 95,0%. Obtivemos as seguintes frequências genotípicas e alélicas (Figura IV.1.8).

Figura IV.1.9. Frequências genotípicas e alélicas do gene *G6PD* na província do Huambo

			Actividade Enzimática					
Normal		Deficiente	Normal			Intermédia		Deficiente
<b>G6PD<sup>+</sup></b>		<b>G6PD<sup>-</sup></b>	<b>G6PD<sup>+</sup></b>			<b>G6PD<sup>±</sup></b>		<b>G6PD<sup>-</sup></b>
G6PDA	G6PDB	<b>G6PDA<sup>-</sup></b>	G6PDAA	G6PDBA	G6PDBB	G6PDAA <sup>-</sup>	G6PDBA <sup>-</sup>	<b>G6PDA<sup>-</sup>A<sup>-</sup></b>
14	28	19	3	26	42	8	23	1
Frequências alélicas								
$f(A)=0,20$			$f(B)=0,60$			$f(A^{-})=0,20$		

Como podemos apreciar na Tabela IV.1.7. referente à distribuição de frequências de infecção por (*P. falciparum*, mistas e outras espécies não *falciparum*) e o polimorfismo presente nos isolados, os nossos resultados demonstraram: 1) em relação ao gene *HBB*, os indivíduos portadores dos genótipos *HbAS* (heterozigóticos), apresentaram uma frequência de infecção por *P. falciparum* de 32,7%, de 26,3% de infecções mistas e de 20,0% para as infecções simples por *P. vivax*. Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a frequência de infecção plasmodial (simples e mistas) e os indivíduos portadores dos genótipos *HbAS* e *HbAA* ( $p=0,021$ ), demonstrando uma menor susceptibilidade à infecção no primeiro grupo, quando comparado com os indivíduos normais (*HbAA*); 2) Relativamente ao gene *G6PD*, os resultados demonstraram que os portadores do alelo deficiente ( $A^{-}$ ), para o gene *G6PD*, estavam infectados unicamente por *P. falciparum* (11,4%), não tendo sido identificada infecção por outras espécies, no total dos isolados (Tabela IV.1.7). Nas mulheres heterozigóticas para o gene *G6PD* ( $G6PDAA^{-}$  e  $G6PDBA^{-}$ ), as únicas que integram a classe de actividade enzimática intermédia, obtivemos frequências de infecção por *P. falciparum* (12,4%), de infecções mistas (3,4%) e de (60,0%) para a infecção simples por *P. malariae* e *P. vivax*. A análise estatística, utilizando o teste exacto de Fisher,

permitiu demonstrar que não existem diferenças significativas entre os portadores do alelo ( $A^-$ ) deficiente (hemizigóticos e homozigóticas) e a heterozigotia para o gene *G6PD* ( $p=0,245$ ), em relação a susceptibilidade à infecção plasmodial (simples e mistas) (Tabela IV.1.7).

Tabela IV.1.7. Frequências de infecção por *Plasmodium* sp. e polimorfismo eritrocitário (*HBB* e *G6PD*)

Polimorfismo Hospedeiro		Prevalência (%) Infecção Plasmodial					
		<i>P. falciparum</i>		Infecções mistas*		<i>P. malariae</i> ou <i>P. vivax</i>	
		n	(%)	n	(%)	N	(%)
Gene <i>HBB</i>	AA	129	63,9%	27	71,1%	4	80,0%
	AS	66	32,7%	10	26,3%	1	20,0%
	SS	7	3,5%	1	2,6%	0	0,0%
Gene <i>G6PD</i> (Actividade Enzimática)	Normal	153	76,1%	28	96,6%	2	40,0%
	Deficiente	23	11,4%	0	0,0%	0	0,0%
	Intermédia	25	12,4%	1	3,4%	3	60,0%

\* **F**- *P. falciparum*; **O** - *P. ovale*; **V**- *P. vivax*; **M** – *P. malariae*; **F+M** – *P. falciparum*+*P. malariae*; **F+V**- *P. falciparum* + *P. vivax*; **F+O** - *P. falciparum* + *P. ovale*; **F+M+O**- *P. falciparum*+*P. malariae* + *P. ovale*; **F+M+V**- *P. falciparum*+*P. malariae* + *P. vivax*.

### Identificação do gene *DARC*

Do total de isolados nos quais se identificou a infecção por *P. vivax*, quer em infecção simples como em mistas, procedeu-se à determinação do genótipo humano relativo ao gene *DARC*. A caracterização dos seleccionados encontra-se sumariada na Tabela IV.1.8. Entre os isolados, seis tinham menos de cinco anos e um tinha oito anos; quatro pertenciam ao sexo feminino e três ao sexo masculino. 42,8% dos indivíduos apresentava o genótipo *HbAS*, sendo os restantes (57,2%) portadoras do genótipo *HbAA*. Quanto ao gene *G6PD*, foi identificado em três crianças do sexo feminino o genótipo  $G6PDBA^-$  e em dois rapazes foi encontrado o genótipo  $G6PDB$ , desconhecendo-se, contudo, os genótipos das restantes duas crianças (por não amplificação). Para além do que já foi publicado (Mendes *et al.*, 2011), salientamos que duas crianças com menos de dois anos de idade, heterozigóticas para ambos os genes *HBB* e *G6PD* estavam infectadas respectivamente por *P. vivax* e por *P. falciparum* + *P.*

*vivax*. Os resultados da microscopia não revelarem a presença de outra espécie para além do *P. falciparum* (dados não apresentados).

Tabela. IV.1.8. Caracterização de indivíduos Duffy-negativo

Idade	Sexo	Tipo infecção	Gene <i>HBB</i>	Gene <i>G6PD</i>
0,6	F	V	AS	BA-
1	F	F + V	AS	BA-
2	F	V	AA	BA-
3	M	F + V	AS	B
3	F	F + V	AA	*****
4	M	F + M + V	AA	*****
8	M	V	AA	B

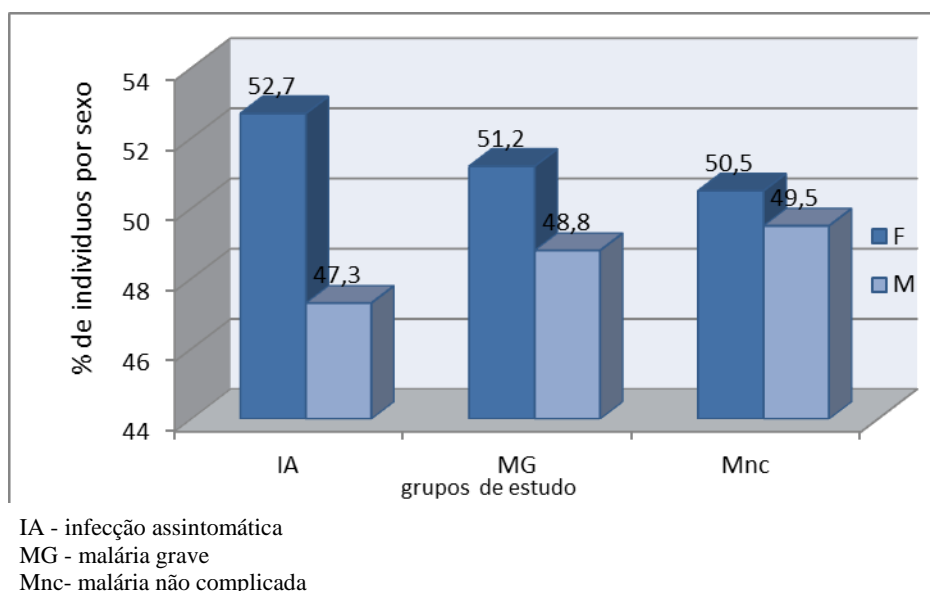
## IV.2. Estudo Analítico Caso-Controlo

Durante o período que decorreu de Maio de 2007 a Maio de 2010, foram seleccionados indivíduos com idade compreendida entre os seis meses e 82 anos, das sete províncias do país, das regiões meso e hiperendémicas, que acorreram ao Centro de Saúde e/ou Hospital, com febre e/ou outros sintomas de malária (segundo os critérios de inclusão descritos). Os indivíduos do grupo controlo (infectados assintomáticos) foram seleccionados durante o estudo exploratório, segundo os critérios já descritos. Os doentes com Mnc foram medicados em regime ambulatorio com os derivados ACT (Artemether+Lumefantrina), enquanto os doentes com MG beneficiaram de internamento hospitalar, tratamento parenteral com quinina, para além de medidas de suporte. As opções terapêuticas utilizadas figuram entre as primeiras opções de tratamento quer, respectivamente para os casos de malária não complicada, quer para a grave, segundo as normas do PNCM (2006).

Dos 499 indivíduos seleccionados para o estudo analítico caso-controlo, 56,3% (281) pertenciam ao grupo dos IA; 24,2% (121) aos de doentes com MG e 19,4% (97) ao grupo dos doentes com Mnc. Da totalidade de indivíduos seleccionados, 51,9% (259) eram do sexo feminino e 48,1% (240) do sexo masculino, distribuídos pelos três grupos de estudo (IA, MG, Mnc), conforme a Figura IV.2.1. Não foram demonstradas

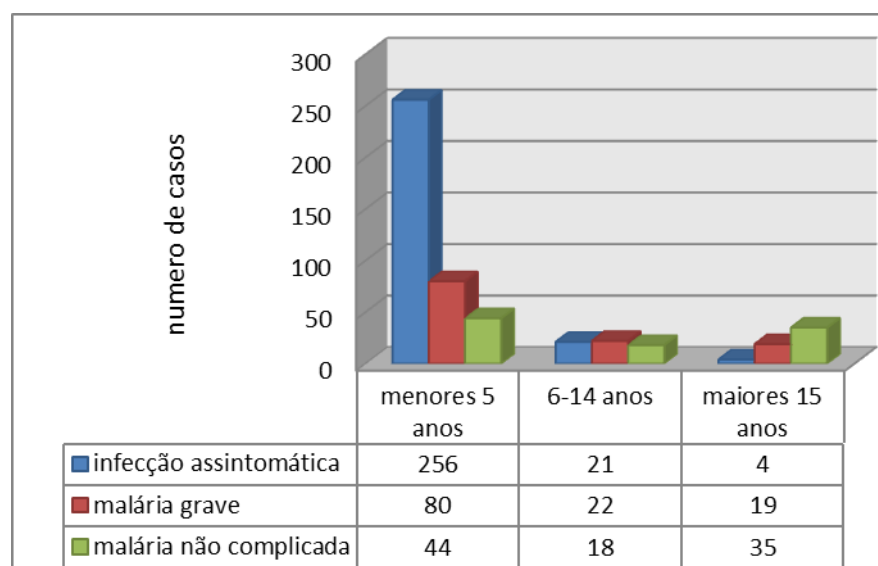
diferenças significativas ( $p=0,574$ ), em relação à frequência de ambos os sexos, pelos três grupos de estudo seleccionados, para uma frequência esperada ( $E$ ) mínima de 2,41.

Figura IV.2.1. Distribuição de frequências (%) dos três grupos de estudo por sexo



Noventa e um por cento (256) dos seleccionados tinham menos de cinco anos e pertenciam ao grupo controlo (Figura IV.2.2). Com menos de cinco anos, do grupo de doentes com MG, foram identificados 66,1%(80) e apresentaram as seguintes manifestações clínicas de malária grave: anemia severa da malária (ASM) (40; 50%), disfunção multiorgânica (DM) (25; 31,3%), hiperparasitémia (HP) (12; 15%) e malária cerebral (MC) (3; 3,8%), enquanto no grupo etário dos seis aos catorze anos, a manifestação clínica de malária grave, mais comum, foi a DM (10; 45,4%), seguida da ASM (9; 41,0%), HP (2; 9,0%) e MC (1; 4,5%). A análise estatística da distribuição de frequências dos três grupos de estudo (IA, MG e Mnc), pelas faixas etárias demonstrou significância estatística ( $p < 0,001$ ). Estes resultados permitem-nos concluir que, nos menores de cinco anos, temos mais IA observados que os esperados e menos doentes com MG e Mnc, se as variáveis fossem independentes. Este resultado denota algum viés da nossa amostragem (Tabela. IV.2.1).

Figura IV.2.2. Distribuição de frequências dos grupos de estudo por grupos etários



Os indivíduos foram seleccionados em sete províncias do país, três das quais enquadradas na região de mesoendemia estável (Bengo, Cuanza Sul e Huambo) onde foi realizado previamente o estudo exploratório. Das quatro restantes províncias, três pertencem à região de hiperendemicidade malárica (Cabinda, Cuanza-Norte e Malange), enquanto apenas uma (Luanda) está igualmente inserida na região de mesoendemia estável.

Tabela IV.2.1. Distribuição (*O*) dos grupos de estudo, por grupos etários

Grupos de estudo		Grupos etários			Total
		≤ 5 anos	6-14 anos	≥15 anos	
Infecção assintomática	( <i>O</i> )	256	21	4	281
	<i>V.Residual</i>	2,9	-2,3	-5,0	
Doentes com malária grave	( <i>O</i> )	80	22	19	121
	<i>V.Residual</i>	-1,3	1,9	1,3	
Doentes com malária não complicada	( <i>O</i> )	44	18	35	97
	<i>V.Residual</i>	-3,5	1,8	7,1	
Total	( <i>O</i> )	380	61	58	499
	<i>FreqEsp</i>	380,0	61,0	58,0	499,0

A distribuição de frequências dos grupos seleccionados pelas sete províncias está sumarizada na Tabela IV.2.2. Não foram demonstradas diferenças significativas na distribuição de frequências dos seleccionados pelas sete províncias, mesmo tratando-se de regiões com níveis de endemicidade diferentes.

Tabela IV.2.2. Distribuição de frequências nos grupos de estudos por províncias segundo os níveis de endemicidade

Níveis de endemicidade	Grupos de estudo							
	Províncias	Infecção assintomática		Malária grave		Malária não complicada		Total
		n	%	n	%	n	%	n
Mesoendemia Estável	Bengo	37	13,2	----	-----	8	8,2	45
	Cuanza-Sul	238	84,7	14	11,6	19	19,6	271
	Huambo	6	2,1	-----	-----	7	7,2	13
	Luanda	-----	-----	62	51,2	31	32,0	93
Hiperendemia	Cabinda	----	-----	22	18,2	5	5,2	27
	Cuanza-Norte	----	-----	8	6,6	19	19,6	27
	Malange	-----	-----	15	12,4	8	8,2	23

Do total de seleccionados com MG, *P. falciparum* foi responsável pela infecção em 100% (121) dos casos, enquanto os indivíduos do grupo com Mnc 99,0% (96) estavam infectados com *P. falciparum* e em apenas 1% (1) foi identificada infecção mista (*P. falciparum* + *P. ovale*). Quanto ao grupo controlo (IA), os nossos resultados demonstraram que 84,7% (238) estavam infectados com *P. falciparum*, enquanto 13,5% (38) encontrava-se infectado com múltiplas espécies plasmódicas; destacando-se a co-infecção *P. falciparum* + *P. malariae* com 7,5%, seguida da *P. falciparum* + *P. ovale* com 2,5%. Relativamente à ocorrência de outras espécies de *Plasmodium*, o estudo demonstrou níveis de frequência sem grande impacto epidemiológico, destacando-se as seguintes espécies: *P. malariae* 0,7% (2) e *P. vivax* 1,1% (3). A associação da composição parasitária da infecção e os três grupos de estudo (IA, MG, Mnc) demonstrou alta significância estatística com um valor de  $p < 0,001$ , rejeitando-se desse modo a nossa  $H_0$ . Estes resultados levam-nos a concluir que temos mais infecções mistas observadas que as esperadas, nos indivíduos assintomáticos e, menos infecções mistas do que seria esperado, nos doentes com malária (grave e não complicada), se as variáveis fossem independentes (Tabela IV.2.3).

Tabela IV.2.3. Distribuição de frequências da composição da(s) população(ões) parasitária(s) presentes na infecção por grupos de estudo

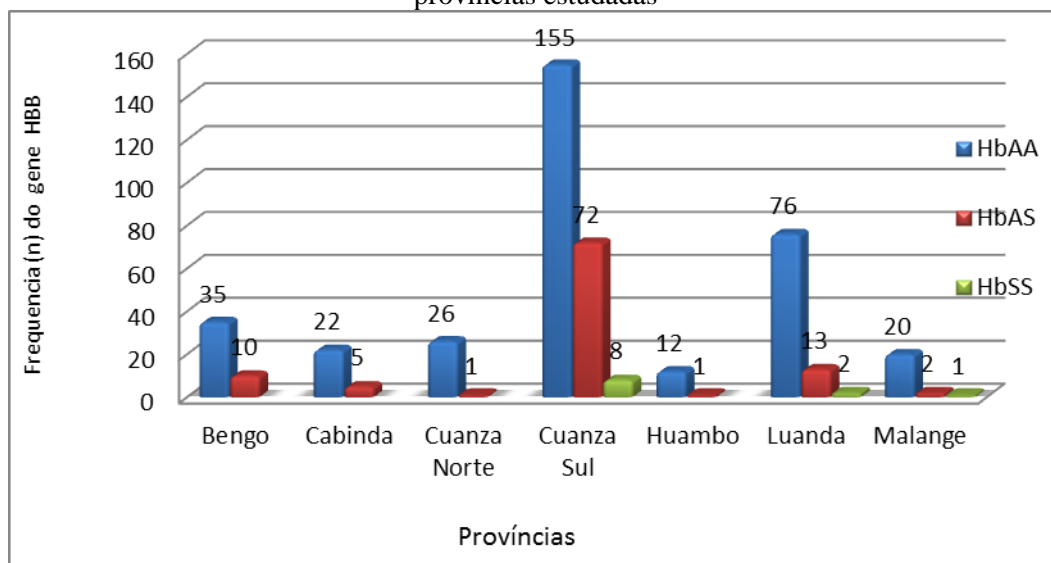
Grupos de estudo		Composição parasitária da infecção			Total
		<i>P. falciparum</i>	Infecções Mistas	<i>P. malariae</i> ou <i>P. vivax</i>	
Infecção assintomática	(O)	238	38	5	281
	(E)	256,2	22,0	2,8	281,0
	<b>V. Residual</b>	-1,1	3,4	1,3	
Doentes com malária grave	(O)	121	0	0	121
	(E)	110,3	9,5	1,2	121,0
	<b>V. Residual</b>	1,0	-3,1	-1,1	
Doentes com malária não complicada	(O)	96	1	0	97
	(E)	88,4	7,6	1,0	97,0
	<b>V. Residual</b>	0,8	-2,4	-1,0	
<b>Total</b>	(O)	455	39	5	499
	(E)	455,0	39,0	5,0	499,0

Em relação ao gene *HBB* dos 499 seleccionados, obtivemos resultados para 461 indivíduos com idade compreendida entre os seis meses e os 82 anos, o que corresponde a um sucesso de amplificação de 92,4%. Destes 75,0% (346) foram *HbAA*, 22,5% (104) *HbAS* e 2,4% (11) *HbSS* (Tabela IV.2.4). O genótipo *HbSS* foi encontrado apenas em três das sete províncias estudadas, revelando um frequência muito baixa (<5%). Assim, obtivemos para Malange (4,3%), Cuanza-Sul (3,4%) e Luanda (2,2%). Quanto aos genótipos *HbAA* e *HbAS* foram identificados em todas as províncias estudadas (Figura IV.2.3). Não foram encontradas diferenças significativas entre as frequências dos genótipos *HBB* e as diferentes províncias, onde realizámos o nosso estudo.

TabelaIV.2.4. Distribuição de frequências dos genótipos *HBB* por grupos etários

Genótipos	Grupos etários					
	≤ 5 anos		6 - 14 anos		≥ 15 anos	
	n	%	n	%	n	%
<b>HbAA</b>	248	72,1	50	82,0	48	85,7
<b>HbAS</b>	88	25,6	8	13,1	8	14,3
<b>HbSS</b>	8	2,3	3	4,9	0	0,0

Figura IV.2.3. Distribuição de frequências (n) dos genótipos do gene *HBB* por províncias estudadas



A análise da associação entre a distribuição dos genótipos *HBB*, pelos diferentes grupos de estudo (IA, MG e Mnc), revelou diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,001$ ), com um valor mínimo de (0) de 2,31, rejeitando-se desse modo a nossa *H<sub>0</sub>*. Estes resultados permitem-nos concluir que temos mais heterozigóticos para o alelo *HbS* observados que os esperados nos indivíduos assintomáticos (grupo controlo) e menos heterozigóticos para o alelo *HbS* do que o esperado nos doentes com malária (grave e não complicada) se as variáveis fossem independentes (Tabela IV.2.5). Do total (27) de doentes com malária (MG e Mnc) e heterozigóticos para o alelo (*HbS*), 40,7% (11) apresentaram sintomas de malária não complicada, enquanto 59,3% (16) apresentaram manifestações de MG: ASM (7; 43,7%); HP (4; 25,0%) e DM (5; 31,3%). Não foi registado, neste grupo de seleccionados, nenhum caso de malária cerebral.

Se tivermos em consideração a frequência alélica (*HbS*) encontrada na população total [ $f(S)=0,17$ ], quando comparada com as frequências encontradas separadamente nos grupos dos seleccionados: IA [ $f(S)=0,19$ ] e dos doentes com malária (MG e Mnc) [ $f(S)=0,09$ ], verificamos que é mais elevada no grupo dos IA do que nos doentes com malária (MG e Mnc).





Tabela IV.2.5. Distribuição de frequências dos genótipos *HBB* por grupos de estudo

Grupos de estudo		Genótipos			Total
		<i>HbAA</i>	<i>HbAS</i>	<i>HbSS</i>	
Infecção assintomática	( <i>O</i> )	160	77	8	245
	( <i>E</i> )	183,9	55,3	5,8	245,0
	<i>V. Residual</i>	-1,8	2,9	0,9	
Doentes com malária grave	( <i>O</i> )	100	16	3	119
	( <i>E</i> )	89,3	26,8	2,8	119,0
	<i>V. Residual</i>	1,1	-2,1	0,1	
Doentes com malária não complicada	( <i>O</i> )	86	11	0	97
	( <i>E</i> )	72,8	21,9	2,3	97,0
	<i>V. Residual</i>	1,5	-2,3	-1,5	
Total	( <i>O</i> )	346	104	11	461
	( <i>E</i> )	346,0	104,0	11,0	461,0

Em relação ao gene *G6PD*, das 499 amostras foram amplificadas 400, o que corresponde a um sucesso de amplificação de 80,2%. Destas, 52,2% (209) são indivíduos do sexo feminino e 47,8% (191) do sexo masculino, cujos genótipos estão distribuídos segundo a Figura IV.2.4.

Figura IV.2.4. Frequências genóticas e alélicas do gene *G6PD* nos grupos de estudo

		Actividade Enzimática							
Normal		Deficiente		Normal			Intermédia		Deficiente
G6PD <sup>+</sup>		G6PD <sup>-</sup>		G6PD <sup>+</sup>			G6PD <sup>±</sup>		G6PD <sup>-</sup>
G6PDA	G6PDB	G6PDA <sup>-</sup>		G6PDAA	G6PDBA	G6PDBB	G6PDAA <sup>-</sup>	G6PDBA <sup>-</sup>	G6PDA <sup>-</sup> A <sup>-</sup>
29(15,1)	121(63,0)	42(21,9)		7(3,4)	45(21,6)	94(45,2)	13(6,3)	44(21,2)	5(2,4)
Frequências alélicas									
f(A)=0,17				f(B)=0,65			f(A <sup>-</sup> )=0,18		

A análise da distribuição dos genótipos *G6PD* para a deficiência em G6PD, por ambos os sexos, revelou alta significância estatística ( $p < 0,001$ ). A distribuição da frequência do alelo ( $A^-$ ) do gene responsável pela deficiência em G6PD, pelos diferentes grupos de estudo mostrou que 14,4% (14) dos homens hemizigóticos apresentaram manifestações clínicas de malária grave, destacando-se a DM (8; 57,1%), a ASM (3; 21,4%), a MC (2; 14,3%) e apenas um caso de hiperparasitêmia (7,1%). Quanto às mulheres deficientes (homozigóticas) (*G6PDA<sup>-</sup>A<sup>-</sup>*), a maioria (4; 1,7%) estavam assintomáticas, tendo nesse grupo sido registado um caso (1,0%) de malária grave (ASM). A distribuição de frequências dos genótipos pelos três grupos de estudo está sumarizada na Tabela IV.2.6.

Tabela IV.2.6. Distribuição de frequências dos genótipos G6PD por grupos de estudo

Genótipos G6PD	Grupos de estudo					
	Infecção assintomática		Malária grave		Malária não complicada	
	n	%	n	%	n	%
<i>G6PDA</i>	16	6,8	9	9,3	4	5,9
<b><i>G6PDA-</i></b>	<b>19</b>	<b>8,1</b>	<b>14</b>	<b>14,4</b>	<b>9</b>	<b>13,2</b>
<b><i>G6PDA-A-</i></b>	<b>4</b>	<b>1,7</b>	<b>1</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>0,0</b>
<i>G6PDAA</i>	2	0,9	2	2,1	3	4,4
<i>G6PDAA-</i>	1	0,4	7	7,2	5	7,4
<i>G6PDB</i>	77	32,8	24	24,7	20	29,4
<i>G6PDBA</i>	27	11,5	13	13,4	5	7,4
<i>G6PDBA-</i>	28	11,9	10	10,3	6	8,8
<i>G6PDBB</i>	61	26,0	17	17,5	16	23,5

A distribuição das frequências do alelo ( $A^-$ ) do gene responsável pela deficiência em G6PD pelas diferentes províncias encontra-se sumarizada na Tabela IV.2.7. Os nossos resultados demonstraram que o alelo ( $A^-$ ) foi encontrado nos indivíduos seleccionados de todas as províncias onde realizamos a nossa investigação, tendo-se constatado a maior frequência na província do Cuanza-Sul. O genótipo *G6PDBA<sup>-</sup>* foi igualmente encontrado em todas as províncias. Quanto ao genótipo *G6PDA<sup>-</sup>A<sup>-</sup>* (mulheres homozigóticas), foi identificado somente na província do Cuanza-Sul.

Tabela IV.2.7. Distribuição do alelo (A<sup>-</sup>) G6PD por diferentes províncias

Províncias		Distribuição do alelo A <sup>-</sup> do gene da deficiência em G6PD							
		A <sup>-</sup>		A-A <sup>-</sup>		AA <sup>-</sup>		BA <sup>-</sup>	
		n	%	n	%	n	%	n	%
	Bengo	1	2,4	0	0,0	1	7,7	7	15,9
	Cabinda	2	4,8	0	0,0	0	0,0	2	4,5
	Cuanza Norte	2	4,8	0	0,0	2	15,4	3	6,8
	Cuanza Sul	20	47,6	5	100,0	1	7,7	23	52,3
	Huambo	1	2,4	0	0,0	0	0,0	1	2,3
	Luanda	10	23,8	0	0,0	7	53,8	7	15,9
	Malange	6	14,3	0	0,0	2	15,4	1	2,3

Para avaliarmos a associação da ocorrência dos polimorfismos da deficiência em G6PD (A<sup>-</sup>) e do traço falciforme (*HbAS*) nos doentes com diferentes níveis de malária clínica (MG e Mnc), comparando-os com o grupo controlo (infectados assintomáticos), reagrupamos os indivíduos pertencentes aos dois grupos de doentes (MG e Mnc) em apenas um (doentes com malária), por razões metodológicas já explicitadas.

O conhecimento da raridade da frequência e do efeito protector do alelo (A<sup>-</sup>) da G6PD, levou-nos a procurar estimar aproximadamente o *RR*, da susceptibilidade à doença, calculando o *OR*, não somente nos deficientes (hemizigóticos-homens e homozigóticas-mulheres), como também em relação às mulheres heterozigóticas (Tabela IV.2.8). Globalmente em relação a G6PD, os nossos resultados apontam que nenhuma evidência para a protecção à malária foi detectada nos indivíduos tanto hemizigóticos como nas heterozigóticas para o gene *G6PD*(A<sup>-</sup>), (*OR*= 1,69; IC 95%; 0,91-3,13; *p*=0,096). Em relação aos hemizigóticos (homens), podemos considerar que obtivemos um resultado aceitável, para o valor de *p*=0,05, contudo não rejeita a *H*<sub>0</sub>. Este resultado leva-nos a concluir que não existe diferença estatisticamente significativa entre a condição de hemizigotia para G6PD(A<sup>-</sup>) e a associação com a protecção à malária (Tabela IV.2.8).

Tabela IV.2.8. Distribuição do alelo (A<sup>-</sup>) G6PD em doentes com malária e infectados assintomáticos

	Total de isolados		Homens		Mulheres		
					Heterozigóticas	Homozigóticas	Normal
Actividade Enz. G6PD	G6PD-	G6PD+	G6PD-	G6PD+	G6PD±	G6PD-	G6PD+
IA	23(11,2)	183 (88,8)	19 (16,9)	93 (83,0)	29 (55,7)	4(4,3)	90 (95,7)
MG+Mnc	24 (17,5)	113 (82,5)	23 (28,7)	57 (71,3)	28 (53,8)	1 (1,8)	56 (98,2)
OR	1,69		1,97		0,92	0,402	
IC95%	0,91-3,13		0,98-3,94		0,42-2,03	0,04-3,68	
p	0,096		0,05		0,84	0,42	

Relativamente ao traço falciforme (heterozigotia *HbS*), os nossos resultados evidenciam a associação do genótipo *HbAS* com a protecção à doença (OR=0,30; IC 95%; 0,18-0,49;  $p < 0,001$ ) demonstrando claramente que existem diferenças estatisticamente significativas entre a heterozigotia *HbS* e o risco de malária, o que rejeita a nossa  $H_0$ . Estes resultados são consistentes e corroboram a clássica teoria de que o traço falciforme confere protecção à malária (Tabela IV.2.9).

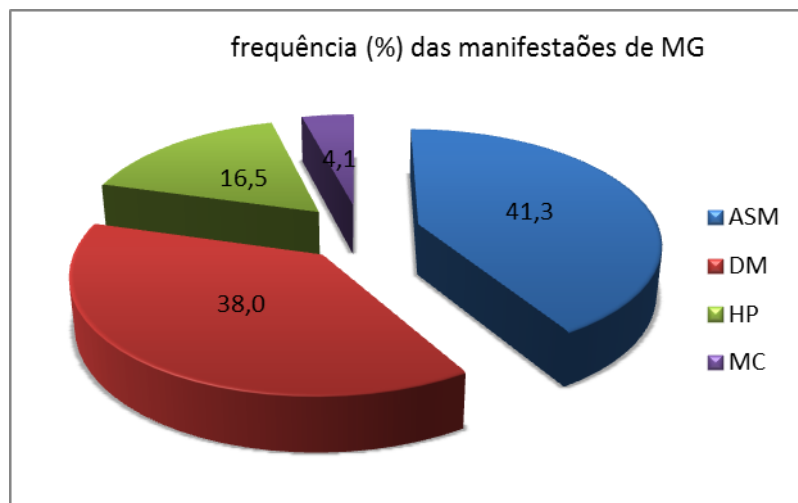
Tabela IV.2.9. Distribuição do genótipo *HbAS* em doentes com malária e infectados assintomáticos

Numero de casos (%)						
Gene HBB Grupos estudo	Total de seleccionados		Homens		Mulheres	
	AS	AA	AS	AA	AS	AA
IA	77(32,5)	160 (67,5)	35 (27,8)	91 (72,2)	42 (37,8)	69(62,2)
MG+Mnc	27 (12,7)	186 (87,3)	16 (14,8)	92 (85,2)	11 (10,5)	94 (89,5)
OR	0,302		0,452		0,192	
IC95%	0,18-0,49		0,23-0,87		0,09-0,40	
p	<0,001		0,018		<0,001	

Relativamente à associação da ocorrência de manifestações graves de malária em indivíduos portadores dos dois polimorfismos em análise [(genótipo *HbAS* e alelo (A<sup>-</sup>) da deficiência em G6PD)], os nossos resultados demonstraram que embora tenham sido identificados 121 casos de MG (distribuídos segundo a Figura IV.2.5), os seleccionados portadores do traço falciforme e do gene da deficiência em G6PD (A<sup>-</sup>),

constituíram somente 21,4% (3) da nossa amostra (Tabela IV.2.10). Os três doentes com malária grave estudados foram caracterizados como se segue: ASM (um ano, sexo M); HP (1,9 meses, sexo M); DM (dois anos, sexo M). Não foi observada, neste grupo, nenhuma manifestação de MC.

Figura IV.2.5. Frequência de manifestações de MG nos seleccionados



ASM- anemia severa da malária  
DM - disfunção multiorgânica  
HP- hiperparasitémia  
MC- malária cerebral

TabelaIV.2.10. Distribuição dos seleccionados portadores de genótipos *HbAS* + *G6PD*(A-) por grupos de estudo

Gene <i>G6PD</i>		Gene <i>HBB</i>		Grupos de estudo					
				IA		MG		Mnc	
				n	%	n	%	n	%
Actividade enzimática da <i>G6PD</i>	Normal	HBB	HbAA	103	64,8	50	78,1	43	89,6
			HbAS	50	31,4	11	17,2	5	10,4
			HbSS	6	3,8	3	4,7	0	0,0
	Deficiente	HBB	HbAA	9	56,3	11	78,6	8	88,9
			HbAS	7	43,8	3	21,4	1	11,1
			HbSS	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Intermédia	HBB	HbAA	18	66,7	17	100,0	8	72,7
			HbAS	7	25,9	0	0,0	3	27,3
			HbSS	2	7,4	0	0,0	0	0,0



# CAPÍTULO. 5

---

## DISCUSSÃO





## V. DISCUSSÃO

### V.1. Estudo Exploratório

A inexistência, em Angola, de publicações oficiais sobre a real prevalência da composição parasitária das infecções plasmódicas e do polimorfismo eritrocitário nas diferentes regiões do país, baseadas na aplicação das novas técnicas de biologia molecular, proporcionou a realização deste estudo sobre a prevalência da infecção por *Plasmodium sp.*, em indivíduos assintomáticos e dos genes *HBB* e *G6PD*.

Em relação às províncias estudadas, os resultados da prevalência da infecção simples e mista, ainda que preocupantes, foram muito variáveis. A biodiversidade das espécies de *Plasmodium sp.*, encontrada nas províncias e identificadas por PCR, permitiu reconhecer o elevado nível de endemicidade da malária no país (índice plasmódico de 23,5%), com predominância da infecção por *P. falciparum* (98,2%). Foi reconfirmada a presença de *P. ovale*, não referida anteriormente em documentos oficiais (PNCM, 2006; MINSA, 2009), mas descrito pela primeira vez por Miranda (2007), e relatada pela primeira vez em Angola a presença de *infecções mistas* (duplas e triplas). A prevalência de infecção por *P. falciparum* nas diferentes províncias estudadas variou de 97,3% a 100%. Resultados similares têm sido referidos em estudos realizados em áreas de alta endemicidade de malária, na África subsariana, demonstrando uma predominância de *P. falciparum* com taxas acima de 80-90% (WHO, 2009; 2010c).

Um resultado surpreendente do nosso estudo foi a identificação de *P. ovale* somente em co-ocorrência com outras duas espécies (*P. falciparum*) ou (*P. falciparum* + *P. malariae*) e não em infecções simples. *P. ovale*, considerado como a última espécie estudada (dos parasitas que infectam os humanos), depois da sua descoberta em 1922 por Stephens (*in* Faye *et al.*, 2002), é confundido, frequentemente, com *P. vivax*. A sua distribuição geográfica e prevalência foram claramente estabelecidas, somente, na década de sessenta do século XX (Collins & Jeffery, 2005; Lim *et al.*, 2010). Esta espécie, apesar de prevalente em todos os continentes, é relativamente comum na África tropical e na Nova Guiné, com prevalências que variam entre os 2% - 10%, sobretudo em crianças. Porém, a sua epidemiologia é pobremente conhecida (Faye *et al.*, 2002).

Um estudo realizado no Senegal, de Junho de 1990 a Maio de 1996, com o objectivo de identificar os critérios parasitológicos que permitissem distinguir os ataques clínicos por *P. ovale* de outras causas de febre, na população infectada com múltiplas espécies, sugeriu que a principal causa da raridade nos registos estatísticos de malária clínica por *P. ovale* na África tropical é o subdiagnóstico (Faye *et al.*, 2002). Este é justificado pelo facto de a maioria dos casos de doença serem tratados sem realizar exames parasitológicos, por *P. ovale* ser facilmente confundido com outras espécies de malária, nomeadamente *P. vivax* e as parasitémias serem muito menores, quando comparadas com as infecções por *P. falciparum* (Faye *et al.*, 2002; Lim *et al.*, 2010). Dados diferentes, em relação à frequência da infecção por *P. ovale*, foram referidos por Gentilini (1981), entre os viajantes que retornam de África para a Europa ou América do Norte, onde a infecção por *P. ovale* foi responsável por até 15% dos quadros clínicos da malária (Gentilini *et al.*, 1981). Dados recentes, resultantes da análise sequencial dos caracteres genéticos de *P. ovale*, demonstraram duas espécies não-recombinantes simpátricas, na África e na Ásia (Sutherland *et al.*, 2010).

A nossa pesquisa foi realizada em três épocas sazonais diferentes do ano, respectivamente: Julho de 2006, Maio de 2007 e Abril de 2009. Os dados da Meteorologia e Geofísica de Angola, mostraram algumas diferenças geoclimáticas e microgeográficas nas três províncias, durante o período da colheita do material biológico (Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica, 2010). Importaria investigar quais os factores que contribuem para a diferença encontrada, particularmente entre o município da Mineira e do Amboim. Não sendo objecto desta investigação a associação da prevalência da infecção às características geoclimáticas e factores demográficos das regiões estudadas podemos, no entanto, sugerir que as prevalências identificadas por PCR, em crianças assintomáticas, no momento da colheita, constituem um indicador da variação dos níveis de transmissão da infecção sobretudo durante a estação seca do ano (Maio a Julho). Verificamos que na província do Cuanza Sul, com a mais baixa altitude e durante a estação seca, encontramos taxas de prevalência de infecção plasmódica mais elevadas, com marcadas diferenças significativas entre os municípios, enquanto o Huambo, com maior altitude e durante a estação das chuvas (Abril), apresentou a taxa de prevalência da infecção mais baixa. Segundo White (2003), as condições óptimas para a transmissão da malária são a baixa altitude, a humidade alta e a temperatura

ambiente entre os 20°C e 30°C. As altitudes para além dos 2.000 m, acima do nível do mar, não favorecem o desenvolvimento do ciclo esporogónico e naturalmente a multiplicação do vector da malária (White, 2003). Bruce *et al.* (2008) na sua pesquisa associou as altas prevalências de *P. falciparum*, encontradas no Distrito de Dedza (Malawi), com a baixa altitude e a proximidade a um terreno pantanoso, para além das variáveis geoclimáticas e dos factores demográficos (Bruce *et al.*, 2008). A variabilidade nas interações entre as espécies, sob diferentes intensidades de transmissão, em simultâneo, com as variadas combinações de espécies simpátricas, pode contribuir para as diferenças observadas, quer na epidemiologia, quer nas apresentações clínicas da malária, entre as regiões endémicas (Richie, 1988; Bruce *et al.*, 2008; Bruce *et al.*, 2011). A maioria das infecções por *Plasmodium sp.* em indivíduos que vivem em regiões endémicas, mesmo tratando-se de crianças com poucos anos de idade, não causam doença, sendo portanto assintomáticas (Miller *et al.*, 1994; Bruce & Day, 2002; Faye *et al.*, 2002; Coura *et al.*, 2006). É comum a parasitémia estar presente sem a ocorrência de sintomas. Os quadros clínicos de malária não complicada estão associados a um aumento na densidade parasitária acima do chamado “limiar da febre”, embora, na maioria das infecções assintomáticas, a densidade parasitária parecer manter-se abaixo deste limiar (Bruce & Day, 2002). Contudo, o papel do efeito “limite” na relação entre o nível da parasitémia e a ocorrência da febre tem sido investigado apenas, em infecções por *P. falciparum* em estudos populacionais, não sendo reportados estudos em outras espécies (Trape *et al.*, 1985; Rogier *et al.*, 1996).

Estudos transversais de prevalência das espécies sugerem que um parasita pode excluir outro ou suprimir a parasitémia para níveis indetectáveis (Richie, 1988). Essas prevalências podem variar reciprocamente entre as estações, traduzidas por um aumento da prevalência de determinada espécie, enquanto a outra diminui, apesar de um aumento paralelo das taxas de transmissão de ambos. Sugerindo desse modo, a supressão de uma espécie por outra (Richie, 1988; Mayxay *et al.*, 2004).

Quanto à prevalência encontrada para *P. malariae*, parece existir alguma concordância com as referências: “*coexiste na maioria das áreas endémicas, especialmente ao longo da África, embora com uma prevalência muito menos comum*” (Mayxay *et al.*, 2004). *P. malariae* é o parasita da malária humana responsável pela

malária quartã, está associado à nefropatia crónica em crianças e tem distribuição mundial. Encontra-se nas regiões tropicais, sobretudo em África (Bruce *et al.*, 2011) e é muitas vezes identificado em co-infecção com *P. falciparum* (Bruce & Day, 2002; Bruce *et al.*, 2011), difere deste último em uma série de características biológicas fundamentais: menor densidade, taxa de crescimento mais lenta, produção de gametócitos mais tardia e uma duração da infecção mais longa e muitas vezes mais crónica (Bruce & Day, 2002; Marques *et al.*, 2005; Bruce *et al.*, 2011). Até ao advento da biologia molecular era difícil reconhecer a sua real prevalência e a sua contribuição no fardo total da doença malárica foi subestimada, devido sobretudo ao baixo nível da parasitémia, não detectada na maioria das situações pela microscopia convencional e a incapacidade para o cultivar *in vitro* (Bruce *et al.*, 2011). Um estudo realizado em Antula, República da Guiné-Bissau (Arez *et al.*, 2003), demonstrou a coexistência das duas espécies embora com prevalências muito diferentes (*P. malariae* 18% e *P. falciparum* 45%). Na Ilha de S. Tomé, um estudo realizado em 1997 durante a época das chuvas (Abril e Maio), utilizando a técnica de PCR, demonstrou prevalências e distribuição das espécies plasmódicas muito similares aos nossos resultados, quer em relação às infecções simples quer em relação às infecções mistas (Pinto *et al.*, 2000): predominância de *P. falciparum*, seguida de *P. malariae* e *P. vivax*, tendo *P. ovale* sido identificado, somente, nas infecções mistas. A importância das interações inter-espécies e das co-infecções com a epidemiologia da malária tem sido evidenciada em vários estudos (Richie, 1988; Bruce & Day, 2002; Snounou, 2004; Bruce *et al.*, 2011). Apesar de, durante vários anos, o valor das infecções mistas ter sido negligenciado, na última década o seu estudo tem vindo a ganhar alguma relevância (Arez *et al.*, 2003; Mayxay *et al.*, 2004; Snounou & White, 2004; Snounou, 2004; Bruce *et al.*, 2008; Bruce *et al.*, 2011). Na maior parte do mundo onde a malária é endémica, as infecções mistas são muito comuns, envolvendo duas ou mais espécies (infecções mistas duplas, triplas e quádruplas), das cinco que infectam os humanos (Zhou *et al.*, 1998; Bruce *et al.*, 2008; Richie, 1988). Uma análise genética longitudinal sobre a composição parasitária da infecção em humanos demonstrou que os indivíduos vivendo em áreas endémicas são cronicamente infectados com múltiplos genótipos das espécies de *Plasmodium*. As co-infecções são uma consequência das superinfecções devido a numerosas picadas de mosquitos anofelinos infectados. A evolução clínica da infecção é

determinada pela capacidade que o hospedeiro tem em regular a densidade parasitária no sangue. Curiosamente, a maioria das infecções não causam sintomas da doença após aquisição de um certo grau de imunidade (Miller *et al.*, 1994; Bruce & Day, 2002; Coura *et al.*, 2006; Bruce *et al.*, 2011). Há muito tempo se sabe que a infecção por uma determinada espécie de parasita da malária pode afectar a susceptibilidade a outras, embora essas interações nunca tenham sido bem compreendidas (Richie, 1988). Sabe-se, também, que a imunossupressão ou a estimulação-cruzada pode influenciar o risco de uma determinada infecção se tornar sintomática e, portanto, alterar os padrões de morbidade (Richie, 1988).

Os nossos resultados demonstraram uma taxa global de prevalência de infecções mistas de 15,7%, em indivíduos assintomáticos, aparentemente saudáveis, não identificadas pela microscopia óptica (dados não apresentados). As prevalências identificadas de infecções mistas durante a estação seca, na província do Cuanza Sul, foram superiores às do Bengo na mesma época do ano, enquanto no Huambo, ao contrário do que seria esperado, não foram observadas infecções mistas nos isolados, não obstante estarem as três províncias localizadas na região mesoendémica estável (PNCM, 2006). Estudos realizados em África (Arez *et al.*, 2003; Marques *et al.*, 2005), em indivíduos assintomáticos, demonstraram frequências diferentes: na República da Guiné-Bissau, num estudo sobre a transmissão da malária no interior das casas, comparando a população parasitária em humanos e nos mosquitos vectores encontrou frequências de infecções mistas que variaram entre 25% e 7% respectivamente em 1995 e 1996 (Arez *et al.*, 2003). Em Moçambique, a análise por PCR, num estudo realizado em 2005, em duas regiões do distrito de Manhiça (Manchiana e Ilha Josina), durante as estações secas e das chuvas revelou, como previsto, taxas de infecções mistas mais elevadas em relação à MO (Marques *et al.*, 2005). Em Manchiana, durante a estação seca (PCR *versus* MO) obtiveram 11% vs. 4%; enquanto na estação húmida 16% vs. 10%; na Ilha Josina: estação seca 40% vs. 7%; e estação das chuvas 22% vs. 14% (Marques *et al.*, 2005). Estudos realizados na Tailândia demonstraram que através da microscopia convencional foi possível detectar menos de 2% de infecções mistas, enquanto no Laos, foram detectadas menos de 1%, verificando-se um aumento para 55% e 65%, respectivamente, quando se usou a PCR (Mayxay *et al.*, 2004). Por outro lado, enquanto a MO detecta sobretudo infecções mistas *duplas*, pela técnica da PCR

detectam-se infecções mistas *triplas e quádruplas*. Resultados similares foram obtidos numa investigação realizada na Tailândia entre Setembro de 1995 e Maio de 1996, utilizando métodos diagnósticos alternativos à microscopia óptica (PCR, coloração com corante laranja de acridina e fluorescência). Pela técnica da PCR, os investigadores demonstraram uma elevada proporção de infecções mistas, envolvendo duas a quatro espécies e alta prevalência de *P. malariae* (24,3%) e *P. ovale* (3,8%), nunca identificados em estudos prévios (Zhou *et al.*, 1998).

O nosso estudo foi realizado em localidades onde os habitantes são na sua maioria (senão a totalidade) nativos, residentes permanentes das aldeias e a amostra constituída, predominantemente, de crianças menores de cinco anos de idade e assintomáticas. Neste grupo, as taxas de prevalência de infecção simples e mistas encontradas eram mais elevadas do que nos restantes grupos etários. Verificou-se que em duas das três províncias estudadas as infecções mistas ocorreram sobretudo em menores de cinco anos de idade com predomínio da co-infecção dupla *P. falciparum*+*P. malariae*. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre a distribuição de frequências de infecções (simples e mistas) e os diferentes grupos etários (análise estatística comprometida devido ao tamanho da amostra), estas observações são consistentes com a teoria da aquisição rápida de imunidade sob condições de alta exposição, sobretudo nas aldeias onde a transmissão da malária é muito maior, quando comparada com as áreas urbanas (Faye *et al.*, 2002). Os resultados de uma meta-análise sobre a transmissão da malária na África subsariana mostraram uma relação linear negativa entre a taxa média de inoculação entomológica anual e o nível de urbanização (Robert *et al.*, 2003). Quatro conclusões foram evidentes: (1) Todos os estudos concluíram que a densidade anofelínea e a probabilidade de transmissão da malária nas áreas urbanas são menores do que nas áreas rurais, sendo a baixa transmissão mais forte nas áreas urbanas centrais quando comparadas com as peri-urbanas; (2) Apesar de ter sido identificada uma pequena diferença entre a área peri-urbana e a rural, esta foi menos dramática do que a comparação entre a área urbana central e a rural; (3) A variação dos índices é muito menor nas áreas peri-urbanas do que nas áreas urbanas centrais; (4) O impacto da urbanização na transmissão é tão marcado quanto as chuvas sazonais (Robert *et al.*, 2003).

Um estudo realizado por McGregor (1956) na Gâmbia (*in* Richie, 1988), em crianças africanas não protegidas por antimaláricos, encontrou taxas de prevalência de infecção por *P. falciparum* de 100%, *P. malariae* (61,5%) e *P. ovale* (7,7%) demonstrou que 61,5% das crianças estavam infectadas com mais de uma espécie de *Plasmodium* detectáveis por exame parasitológico directo (gota espessa). Dados reportados, em 1980, por Molineaux (1980) no Projecto Garki, mostraram taxas de prevalência mais elevadas, quer nos grupos etários menores de cinco anos, quer em menores de nove anos. No mesmo Projecto Garki, outro estudo realizado em adultos nigerianos constatou que *P. malariae* ocorria, com maior frequência, associado a *P. falciparum* (Molineaux & Gramiccia, 1980).

Estudos recentes (Bruce & Day, 2002; Snounou & White, 2004; Bruce *et al.*, 2008; Bruce *et al.*, 2011) sugerem que a manutenção de infecções assintomáticas parece desempenhar um papel fundamental na prevenção da doença. Nas regiões endémicas a questão que se coloca, em relação à diminuição *vs.* ausência de sintomas, está em reconhecer se a doença é o resultado, por um lado, da exposição a uma maior multiplicidade de variantes antigénicas ou se, por outro lado, é consequência da indução de respostas a mecanismos não específicos densidade-dependentes, implicados na regulação da carga parasitária e que parecem prevenir a doença através da limitação dessa mesma densidade (Bruce & Day, 2002). Outros estudos sugerem ainda, que a interacção de múltiplas espécies plasmódicas pode ter algum efeito protector na doença. Esta protecção parece ser grandemente dependente do nível de transmissão e da sazonalidade da malária, sendo responsável pelas múltiplas diferenças epidemiológicas e pela dinâmica da imunidade adquirida (Bruce & Day, 2002; Bruce *et al.*, 2008; Bruce *et al.*, 2011). Advoga-se que em áreas holo e hiperendémicas (como por exemplo, certas regiões de África tropical e da Papua Nova Guiné), onde há intensa transmissão de *P. falciparum*, as pessoas podem ser expostas a mais de uma picada do mosquito infectado por dia e várias vezes ao longo das suas vidas. Nestas regiões as taxas de morbi-mortalidade devido a malária são consideráveis sobretudo durante a infância. A intensidade da transmissão permite o desenvolvimento de uma imunidade duradoura e forte, sendo a maioria das infecções assintomáticas, apesar de o fardo da doença continuar a ser muito elevado em crianças e jovens (Bruce & Day, 2002; Mayxay *et al.*, 2004; Snounou & White, 2004; Coura *et al.*, 2006).

Segundo Mayxay (2004), estudos realizados com modelos matemáticos sugerem que nas infecções mistas de *P. falciparum* + *P. malariae*, esta segunda espécie pode reduzir o pico da parasitemia da primeira em 50%, enquanto *P. vivax* pode manter estável a parasitemia durante a infecção aguda. As baixas temperaturas corporais encontradas nas infecções mistas com *P. falciparum* sugerem que possam estar associadas a menor fenómeno da citoaderência e consequentemente a uma forma menos severa de doença (Mayxay *et al.*, 2004). Outras evidências na literatura advogam que a infecção por *P. ovale* pode ser suprimida por *P. falciparum* (Garnham, 1966) e, tem sido sugerido que a infecção por *P. malariae* pode suprimir os ataques clínicos de *P. falciparum* (Black *et al.*, 1994). Estudos realizados em crianças africanas demonstraram que as infecções mistas por *P. falciparum* + *P. malariae* e/ou *P. ovale* não apresentavam quaisquer tipo de sintomas e caso estes persistissem seriam muito menos graves do que as infecções simples por *P. falciparum* (Mayxay *et al.*, 2004). Por outro lado, verificaram que as crianças com infecções mistas (*P. falciparum* + *P. malariae* + *P. ovale*) apresentam altos títulos de anticorpos, quando comparadas com as infecções simples.

Em relação à prevalência de *P. vivax*, os nossos resultados (2,5%) corroboram as baixas taxas de prevalência descritas para a África Central e Ocidental, que durante muito tempo foram atribuídas à resistência inata (Mayne, 1930) (*in* Dhorda *et al.*, 2011) do hospedeiro humano à infecção, resultante da alta prevalência de indivíduos Duffy-negativos (Miller *et al.*, 1976; Richie, 1988; Cavasini, 2001; Baird, 2008). Tal como nos referimos no capítulo da introdução, as investigações actuais contrapõem esta hipótese porquanto, recentemente, foram identificadas infecções por *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos em Angola, Quênia e Madagáscar (Mendes *et al.*, 2011; Ryan *et al.*, 2006; Ménard *et al.*, 2010) e no Brasil (Cavasini *et al.*, 2007) sugerindo que *P. vivax* é capaz de utilizar outro(s) receptor(es) como alternativa à invasão dos glóbulos vermelhos Duffy-negativos. Outra hipótese sugerida para explicar as baixas prevalências observadas na infecção por *P. vivax* foi formulada por Culleton (2009) num estudo realizado em Ponta Negra (República do Congo), segundo a qual a baixa prevalência estaria relacionada com a desproporção entre os indivíduos expostos à infecção e a frequência dos portadores do antígeno Duffy (Duffy positivos) tanto hetero como homozigóticos. Para este investigador os resultados da pesquisa seriam



contraditórios pois foram encontradas taxas de exposição à picada de mosquito infectado com *P. vivax* de 13% e baixas frequências (5%) de indivíduos Duffy positivo (os responsáveis em manter a transmissão da infecção) (Culleton *et al.*, 2009). Outro aspecto relevante sugerido por Mendes *et al.* (2011) está relacionado com a discrepância entre, respectivamente, a alta e a baixa proporção de mosquitos e indivíduos infectados. Estes resultados poderão ser resultado do facto de esta espécie formar hipnozoítos no hospedeiro humano, podendo não ser detectada numa análise de sangue periférico. Isto fará com que a sua existência possa ter vindo a passar despercebida quando a pesquisa é feita apenas, em humanos, sendo mais visível nos mosquitos (Mendes *et al.*, 2011).

Estes dados são consistentes com os relatos de que a parasitémia por *P. vivax* está, na maioria dos casos, abaixo do limiar de detecção pela microscopia (Bruce *et al.*, 2011) e que as infecções crónicas (silenciosas) podem sugerir um certo grau de imunidade contra *P. vivax* e/ou estar relacionadas com a redução da susceptibilidade do eritrócito a *P. vivax* nos heterozigóticos Duffy-negativo. Sabe-se hoje, que as infecções mistas por *P. vivax* + *P. falciparum* parecem estar associadas a baixas parasitémias de *P. falciparum* quando comparadas com infecções isoladas por este último. Além disso, estas infecções parecem ter um baixo risco de falência terapêutica. Embora não confirmado, pensa-se que *P. vivax* possa atenuar a severidade da infecção por *P. falciparum* (Snounou & White, 2004; Culleton *et al.*, 2008; Milner *et al.*, 2009), sugerindo um certo grau de imunidade cruzada entre as espécies (Mayxay *et al.*, 2004). Dados diferentes foram referidos por Mckenzie (2006) num estudo realizado na província de Tak, Tailândia, em doentes febris com o diagnóstico de malária. Os indivíduos com infecção mista (*P. falciparum* + *P. vivax*) apresentavam temperatura oral mais elevada quando comparados com os infectados com apenas uma das espécies sem, no entanto, ter sido demonstrada qualquer correlação entre a temperatura e a parasitémia (Mckenzie *et al.*, 2006). Noutro estudo realizado em Manaus, Brasil, 17 doentes hospitalizados com infecção por *P. vivax*, confirmada por PCR, apresentaram manifestações de gravidade da malária (icterícia e anemia severa) (Alexandre *et al.*, 2010), contrariando de algum modo o conceito da “benignidade” (Clark & Cowden, 1999) da espécie.

## V.2. Estudo De Caso-Controlo

A compreensão da variabilidade da resposta do hospedeiro humano à infecção continua a ser um dos grandes desafios da investigação médica. Data da década de cinquenta do século XX a associação entre alta prevalência de drepanocitose, talassémias e deficiência em glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), com protecção selectiva dos heterozigóticos contra à infecção por *P. falciparum*. As teorias clássicas de Haldane (1948-49) e Allison (1954) sobre a vantagem selectiva do heterozigótico são tradicionalmente aceites, sobretudo a alusiva ao gene da anemia falciforme e a distribuição das áreas endémicas de malária (Flint *et al.*, 1998; Hill, 2001).

Neste estudo foram analisados alguns polimorfismos genéticos do eritrócito e a sua possível associação à malária. Relativamente ao polimorfismo no gene da *HBB*, os nossos resultados demonstraram uma frequência de 21,4% para o genótipo *HbAS* e de 2,7 % para *HbSS*, com uma frequência alélica de  $[f(S)]$  de 0,17. Estes valores revelam frequências muito inferiores às encontradas em algumas regiões da África subsariana, apesar de alguns países da costa ocidental e do norte de África apresentarem valores semelhantes (Makani *et al.*, 2007). Dados diferentes foram obtidos num estudo de coorte realizado no Quénia por Komba *et al.* (2009), onde foram encontradas prevalências de 0,8% para os drepanocíticos (homozigotia-*HbSS*), 14,9% para os indivíduos portadores do genótipo *HbAS* (portadores do traço caliciforme) (Komba *et al.*, 2009). Outro estudo realizado na República da Guiné, por Millimono (2011), demonstrou frequências de 9,6% e 5,7% para o alelo *HbS* e para o alelo deficiente da G6PD (variante G6PDA<sup>-</sup>), respectivamente (Millimono *et al.*, 2011). Segundo a OMS (OMS, 2006a, 2006b), a prevalência do traço falciforme (heterozigotia *HbAS*) oscila entre os 10% e 40% na África equatorial, diminuindo para 1 a 2% no norte de África e menos de 1% na África do Sul, sendo de 2% a percentagem de crianças que nascem com homozigotia (*HbSS*) (OMS, 2006a, 2006b). A baixa frequência do alelo *HbS* encontrada nos isolados do nosso estudo poderia ter sido resultante de duas razões: 1) A pressão selectiva da malária, a ter ocorrido, não foi suficientemente forte para evidenciar a alta frequência do alelo *HbS*, que seria esperado encontrar tratando-se de regiões de hiperendemia e mesoendemia estável; ou 2) Como advoga Kwiatkowski

(2005), teriam supostamente ocorrido diferentes respostas evolutivas independentes da pressão selectiva da malária, como tem sido observado em distintos grupos populacionais. Por exemplo, na população do Dogon no Mali, que apresenta uma frequência muito menor do alelo HbS do que a maioria de outros grupos africanos da região ocidental, foi encontrada uma alta frequência do alelo HbC (Agarwal *et al.*, 2000; Kwiatkowski, 2005). Outro nível de complexidade resulta do facto, em África, o alelo *HbS* estar presente em quatro haplótipos distintos (Lapoumeroulie *et al.*, 1992) e as diferenças observadas terem sido geralmente interpretadas como se a mesma mutação tivesse surgido, de modo independente, em quatro populações diferentes de África (Flint *et al.*, 1998).

Quanto à associação do gene *HBB* e a presumível protecção à malária, os nossos resultados são consistentes e revelaram que o traço falciforme (heterozigotia *HbAS*) confere protecção contra a malária (MG e Mnc). Contudo, a maioria das investigações faz referência à associação do polimorfismo aos casos de malária grave (Aidoo *et al.*, 2002; Komba *et al.*, 2009; Guindo *et al.*, 2011). Sabe-se, no entanto, que a variante *HbS* não parece diminuir o risco de infecção por *P. falciparum*, mas evidencia ser protector contra as formas graves de doença (MG), provavelmente, porque dificulta a invasão e crescimento dos parasitas no interior dos eritrócitos (Pasvol *et al.*, 1978; Min-Oo & Gros, 2005), não obstante a malária ser muitas vezes fatal em indivíduos homozigóticos (*HbSS*).

A histórica correlação geográfica entre a distribuição da deficiência em G6PD e a malária sugere que a frequência da primeira tem aumentado em consequência da pressão selectiva exercida pela malária (Ruwende & Hill, 1998). No entanto, as tentativas para confirmar a protecção contra a malária em indivíduos deficientes em G6PD, em estudos caso-controlo, têm produzido resultados controversos.

Os nossos resultados demonstraram a ocorrência do genótipo G6PDA<sup>-</sup> (hemizigóticos) em 18,6% dos indivíduos estudados e de 2,3% para G6PDA<sup>-</sup>A<sup>-</sup> (homozigóticas) e uma frequência alélica [ $f(A^-)$ ] de 0,15. Embora estejam descritos vários polimorfismos no gene na África subsariana, a variante G6PDA<sup>-</sup> está associada a uma actividade enzimática de apenas 12% do normal, em indivíduos homo ou hemizigóticos. Este alelo ocorre com uma frequência que varia entre os cinco e os 25% nas populações subsarianas (May *et al.*, 2000; Enevold *et al.*, 2005; Cappellini &

Fiorelli, 2008). As baixas frequências alélicas encontradas, quer em relação ao *HbS*, quer da variante G6PDA<sup>-</sup>, confirmam de algum modo os resultados de um estudo anterior realizado em Luanda por Miranda (2007), contrariando os resultados obtidos por Millimono (2011), que demonstrou elevadas frequências para a variante G6PDA<sup>-</sup> (Miranda *et al.*, 2007; Millimono *et al.*, 2011).

Se, na análise das baixas frequências encontradas nos isolados para a variante G6PDA<sup>-</sup> tivermos em consideração as características híbridas da população angolana e da sua origem, predominantemente Bantu (Redinha, 1975), podemos admitir a consistência dos nossos resultados quanto à frequência encontrada, pois estão em concordância com os achados referidos por Jenkins (1967), relativos à baixa incidência da deficiência em G6PD nos Bosquímanos e no grupo híbrido Bush-Bantu. (Jenkins *et al.*, 1967).

Sabe-se que a maioria dos indivíduos portadores do alelo G6PDA<sup>-</sup> são, normalmente assintomáticos. A anemia hemolítica aguda pode manifestar-se quer em mulheres hetero e homozigóticas como nos homens hemizigóticos, sobretudo se os seus eritrócitos estiverem sujeitos a um maior stresse oxidativo (Ruwende & Hill, 1998; Enevold *et al.*, 2005). Esta condição pode também ser induzida por agentes anti-inflamatórios ou quimioterapêuticos, incluindo os anti-maláricos tais como a sulfadoxina-pirimetamina, a lapudrina-dapsona e a primaquina. Este facto assume particular importância tanto em áreas endémicas de malária, particularmente na África subsariana, como em condições epidémicas, por exemplo; na república de Cabo Verde (Alves, 2011). No nosso país, a recente (re)confirmação da presença de outras espécies para além de *P. falciparum* e de infecções mistas (antes subestimadas), poderá justificar a utilização da primaquina como gametocida durante o curso da doença, especialmente em regimes terapêuticos cujos fármacos não tenham efeito gametocida (Baird & Hoffman, 2004).

Na nossa investigação não foi encontrada, quer nos indivíduos hemizigóticos, quer nos heterozigóticos para o gene *G6PD* (*A<sup>-</sup>*), nenhuma evidência para a protecção à malária (MG e Mnc). Outras pesquisas, de base populacional, têm demonstrado resultados diferentes; por exemplo, Guindo (2007), num estudo realizado no Mali, demonstrou que o estado de hemizigotia para a deficiência em G6PD conferia significativa protecção contra a malária severa, assim como o estado de homozigotia

(Guindo *et al.*, 2007).

Tratando-se de um primeiro estudo de genética populacional, com esta dimensão, em Angola, estes resultados carecem de confirmação; novos estudos, mais aprofundados e com uma maior dimensão amostral, deverão ser realizados.



# CAPÍTULO. 6

---

## CONCLUSÕES E LIMITAÇÕES DO ESTUDO





## VI. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos últimos 10.000 anos, a malária parece ter exercido uma força dominante na evolução e selecção de variantes genéticas que aparentam conferir algum grau de protecção à doença. A identificação dos genes envolvidos e a sua influência na evolução clínica da infecção é um aspecto potencialmente útil na investigação da relação “hospedeiro-parasita” (Williams, 2006a). Até à data, alguns dos melhores polimorfismos descritos de protecção contra a malária estão relacionados com os genes que envolvem a estrutura ou a função dos glóbulos vermelhos. Nos últimos anos, alguns avanços significativos têm melhorado a compreensão da importância de muitos desses genes, sendo que o desafio para o futuro deve ser o de converter estes avanços em novas abordagens para a prevenção e tratamento da malária. Entre outros, é possível salientar como fontes importantes de variabilidade na susceptibilidade à malária e gravidade da doença factores intrínsecos ao hospedeiro, tais como polimorfismos genéticos relacionados com as células sanguíneas, nomeadamente a drepanocitose ( $\beta$ -globina, gene *HBB*), deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, gene *G6PD*), antígeno Duffy-negativo - gene *DARC*) e factores parasitários como a composição da(s) população(ões) parasitária(s) presentes na infecção.

A escolha do tema surgiu da necessidade em aprofundar o conhecimento, tendo sido parte objecto de investigação prévia no país, num trabalho de pequenas dimensões (Miranda *et al.*, 2007), sobre a frequência de alguns polimorfismos eritrocitários. No presente estudo, além dos polimorfismos eritrocitários, investigou-se também a composição parasitária da infecção, averiguando se estariam associados na protecção à malária e se seria possível relacioná-los com o quadro geral das manifestações da malária: infecção assintomática e doença (malária grave e malária não complicada).

O objectivo geral desta tese de doutoramento baseou-se no estudo de algumas determinantes genéticas do hospedeiro humano relacionadas com a protecção à malária, nomeadamente a anemia de células falciformes, a deficiência em G6PD e de um provável envolvimento da piruvato cinase (estudo não realizado por razões apresentadas na secção sobre limitações do estudo), contribuindo para a compreensão da epidemiologia da doença no país e na adopção de medidas de controlo mais apropriadas.

Os resultados globais desta investigação reconfirmam a presença de *P. ovale*, até então controversa no país. Relata pela primeira vez em Angola a presença de infecções mistas (duplas e triplas) e de infecção por *P. vivax* em indivíduos Duffy-negativos. Demonstra prevalências superiores às anteriormente descritas em relação às duas espécies parasitárias: *P. falciparum* 98,2% vs 92% e *P. malariae* 10,7% vs 1% e inferiores às referidas em relação à *P. vivax* 2,5% vs 7%.

Relativamente ao polimorfismo no gene da *HBB*, os valores encontrados revelam frequências muito inferiores às referidas em algumas regiões da África subsariana (Aluoch, 1997; Komba *et al.*, 2009), apesar de alguns países da costa ocidental e do norte de África apresentarem valores similares. Quanto à associação do gene *HBB* à presumível protecção à malária, os nossos resultados são consistentes e revelam que o traço falciforme (heterozigotia *HbAS*) confere protecção à malária (MG e Mnc), apesar de a maioria das investigações fazerem referência à associação do polimorfismo no gene da *HBB* e os casos graves de malária (Komba *et al.*, 2009; Guindo *et al.*, 2011). Quanto a G6PD (variante A<sup>-</sup>), não foi encontrada, quer nos indivíduos hemizigóticos, quer nos heterozigóticos para o alelo G6PD (A<sup>-</sup>) nenhuma evidência para a protecção à malária. As baixas frequências alélicas (A<sup>-</sup>) da G6PD, encontradas justificam-se pela origem predominantemente bantu da maioria da população angolana (Redinha, 1975), considerada uma população com baixa incidência da deficiência em G6PD (Jenkins *et al.*, 1967).

Os resultados globais desta investigação contribuíram para a clarificação da prevalência das espécies de *Plasmodium* circulantes. O conhecimento da prevalência das infecções mistas no país justifica uma melhor adequação da política nacional de controlo da doença, a revisão das normas de tratamento e uma melhoria da qualidade do diagnóstico parasitológico. A baixa frequência dos alelos *HbS* e *G6PDA*<sup>-</sup> encontrada nos isolados do nosso estudo, não apontam para adopção de políticas que prevejam uma triagem neonatal, mas não invalidam o aconselhamento pré-nupcial, pré-natal e familiar.

A utilização de fármacos, nomeadamente a primaquina e outros agentes químicos associados à hemólise aguda em indivíduos deficientes em G6PD, não constitui um sério problema de saúde pública, podendo o PNCM continuar a preconizar a sua utilização, pontualmente, em regimes terapêuticos cujos fármacos não tenham efeito gametocida.

Como principais implicações dos nossos resultados, a ter em conta no futuro, apontamos as seguintes: 1) prever o desenho de estudos epidemiológicos e de intervenção, nas diferentes áreas de transmissão da doença com diferentes níveis de endemicidade, tendo em conta as diferentes épocas sazonais de transmissão; 2) não ser abandonada a importância dos infectados assintomáticos (*i.e.* se seriam assintomáticos de curto ou longo termo) (Le Port *et al.*, 2008), prevendo estudos longitudinais que devem estar relacionados quer, com a aquisição da imunidade, quer com a evolução da diversidade genética das espécies parasitárias envolvidas.

Tratando-se de um primeiro estudo de genética populacional com esta abrangência no país e relacionado com uma provável associação de genes do hospedeiro humano na protecção à malária, a compreensão da interacção dos mecanismos de protecção constituem um valioso instrumento de interesse médico. Contudo estes resultados carecem de confirmação. Para isso, novos estudos mais aprofundados deverão ser realizados, a fim de se verificar se os resultados obtidos têm um verdadeiro significado biológico ou se apenas são resultantes de viés da amostragem.

## **VI.1.LIMITAÇÕES DO ESTUDO**

O Objectivo Geral do presente projecto de doutoramento foi determinar o efeito de alguns factores genéticos do hospedeiro (relacionados com polimorfismos eritrocitários) e factores parasitários (composição parasitária da infecção) na susceptibilidade à malária e gravidade da doença, analisando e comparando três diferentes grupos (estudo de caso-controlo) com diferentes níveis de malária clínica (malária não complicada e malária grave) e infecção assintomática.

Relativamente aos factores genéticos do hospedeiro, foram estabelecidos como objectivos específicos estudar alguns dos principais factores do hospedeiro que podem determinar a susceptibilidade à malária e a sua evolução clínica - drepanocitose ( $\beta$ -globina, gene *HBB*), deficiência em glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PD, gene *G6PD*) e deficiência em piruvato cinase (PK, gene *PKLR*).

As limitações de carácter logístico e o desconhecimento dos factores ecológicos e genéticos da população em estudo condicionaram a obtenção de uma amostra cuja dimensão e características respondessem aos pressupostos defendidos por Waples (1991) (*in* Dimmick *et al.*, 2001).

Durante a execução desta tese e na impossibilidade de determinar a prevalência do gene *PKLR*, pretendeu-se substituir este terceiro ponto pelo estudo dos genes HO-I e CYPOR, codificantes da heme-oxigenase I e NADPH citocromo P450 redutase, respectivamente. Esse estudo teria relevância uma vez que trabalhos recentes com modelo murino implicaram o sistema heme/HO-I na patogénese da malária cerebral e protecção contra a falência hepática induzida pela malária (Ferreira *et al.*, 2008; Seixas *et al.*, 2009). Variantes do gene HMOX-1 (codifica HO-I) foram associados a um maior risco de doentes infectados com *P. falciparum* poderem desenvolver um quadro de malária cerebral (Takeda *et al.*, 2005; Sambo *et al.*, 2010). O nosso objectivo seria determinar as sequências de DNA dos genes CYPOR e HMOX-I nos indivíduos infectados com *P. falciparum* com quadro clínico bem estabelecido para malária (grave e não complicada) e infectados assintomáticos, colhidos no âmbito do projecto de doutoramento.

A ausência de financiamento condicionou uma abordagem que permitisse um significativo avanço no conhecimento sobre o tema.

A análise crítica das actividades desenvolvidas face aos objectivos propostos permite-nos concluir que os mesmos foram atingidos, apesar das dificuldades identificadas a nível local, acrescidas as de carácter logístico.

# CAPÍTULO. 7

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal A., Guindo A., Cissoko Y., Taylor J.G., Coulibaly D., Kone A., Kayentao K., Djimde A., Plowe C.V., Doumbo O., Welles T.E., Diallo D. 2000. Hemoglobin C associated with protection from severe malaria in the Dogon of Mali, a West African population with a low prevalence of hemoglobina S. *Blood Journal* **96** (7): 2358-2363.
- Ahuja S. 2006. Development of a recombinant protein vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria. *Department of Microbiology and Tumor Biology Center* (MTC). Karolinske Institute. Stockholm. Sweden.
- Aidoo M., Terlouw D.J., Kolczak M.S., McElroy P.D., Kuile F.O., Kariuki S., Nahlen B.L., Lal A.A., Udhayakumar V. 2002. Protective effects of the sickle cell gene against malaria morbidity and mortality. *Lancet* **359**: 1311–12.
- Aitman T.J., Cooper L.D., Norsworthy P.J., Wahid F.N., Gray J.K., Curtis B.R., McKeigue P.M., Kwiatkowski D., Greenwood B.M., Snow R.W., Hill A.V., Scott J. 2000. Malaria susceptibility and CD36 mutation. *Nature* **405**: 1015– 1016.
- Alexandre M.A., Ferreira C.O., Siqueira A.M., Magalhães B.L., Mourão M.P.G, Lacerda M.V., and Alecrim M.G.C. 2010. Severe *Plasmodium vivax* Malaria, Brazilian Amazon. *Emerging Infectious Diseases* **16** (10). DOI:10.3201/eid1610.100685.
- Alves J.B. 2011. Epidemiologia da Malária em Santiago, Cabo Verde - Factores genéticos humanos e estrutura populacional do mosquito vector. *Dissertação de Doutorado*. CMDT/IHMT- UNL. Lisboa, Portugal.
- Aluoch J.R. 1997. Higher resistance to *Plasmodium falciparum* infection in patients with homozygous sickle cell disease in western Kenya. *Tropical Medicine and International Health* **2** (6): 568–571.
- Amino R., Thiberge S., Martin B., Celli S., Shorte S., Frischknecht F. and Menard R. 2006. Quantitative imaging of *Plasmodium* transmission from mosquito to mammal. *Nat Med.* **12**: 220–224.
- Anuradha S., Prabhash K., Shome D.K., Gaiha M., Singh N.P., Agarwal S.K., Mandal A.K., Jain S., Chaturvedi K.U., Sawlani K.K. 1999. Symmetric peripheral gangrene and *falciparum* malaria-an interesting association. *J Assoc Physicians India* **47**: 733-735.
- Arez A.P., Pinto J., Palsson K., Snounou G., Jaenson T.G.T. & do Rosario V.E. 2003. Transmission of mixed *plasmodium* species and *plasmodium falciparum* genotypes. *Am J Trop Med Hyg.* **68** (2): 161-168.
- Artavanis-Tsakonas K., Tongren J.E. and Riley E.M. 2003. The war between the malaria parasite and the immune system: immunity, immunoregulation and immunopathology. *Clinical & Experimental Immunology* **133**: 145-152.

- Artavanis-Tsakonas K. & Riley E.M. 2002. Innate Immune Response to Malaria: Rapid induction of IFN- $\gamma$  from Human NK Cells by live *Plasmodium falciparum*-Infected Erythrocytes. *The Journal Immunology* **169**: 2956-2963.
- Ashley-Koch A., Yang Q. and Olney R.S. 2000. Sick cell hemoglobin (*HbS*) allele and sick cell disease: a huge review. *American Journal of Epidemiology* **151** (9): 839–45.
- Baer K., Roosevelt M., Clarkson J.A.B., van Rooijen N., Schnieder T. and Frevert U. 2007. Kupffer cells are obligatory for *Plasmodium yoelii* sporozoite infection of the liver. *Cellular Microbiology* **9** (2): 397–412.
- Baird J.K. 2008. Editorials. Real-world therapies and the problem of *vivax* malaria. *N Engl J Med.* **359**:2601-2603.
- Baird J.K. & Hoffman S.L.2004. Primaquine therapy for malaria. *Clin Infect Dis.* **39**: 1336-1345.
- Barry A.E. 2005.Malaria epidemiology: Insights from the genome of the malaria parasite. *Journal of Molecular and Genetic Medicine* **1** (2): 76-86.
- Bellamy R, Kwiatkowski D. and Hill A.V.S. 1998. Absence of an association between intercellular adhesion molecule 1, complement receptor 1 and interleukin 1 receptor antagonist gene polymorphisms and severe malaria in a West African population. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **92**: 312-316.
- Bereczky S., Montgomery S.M., Troye-Blomberg M., Rooth I., Shaw M.A. & Färnert A. 2004. Elevated anti-malarial IgE in asymptomatic individuals is associated with reduced risk for subsequent clinical malaria. *Int J Parasitol.* **34**: 935-942.
- Beutler E., Vulliamy T., Luzzatto L. 1996. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **22** (4):49-56.ISSN No. 1079-9796.
- Beutler E. 1994. Review article. G6pd deficiency. *Blood* **84** (11): 3613-3636.
- Black J., Hommel M., Snounou G., Pinder M. 1994. Mixed infections with *Plasmodium falciparum* and *P. malariae* and fever in malaria. *Lancet* **343**: 1095.26.
- Blackwell J.M. 2001. Genetics and genomics in infectious disease susceptibility. *Trends in Molecular Medicine* **7** (11): 521-526.
- Blum P. & Stephens D. 2001. Severe *falciparum* malaria in five soldiers from East Timor: a case series and literature review. *Anaesth Intensive Care* **29**: 426 - 434.
- Bonifácio S.L. & Novaretti M.C.Z. 2009. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* **31** (2): 104-111.
- Boutlis C.S., Yeo T.W. & Anstey N.M. 2006. Malaria tolerance - for whom the cell tolls? *Trends in Parasitology* **22** (8): 371-377.



- Breman J.G. *et al.* 2010. Clinical manifestations of malaria. ©2010UpToDate. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
- Brown A.E., Kain K.C., Pipithkul J., and Webster H.K. 1992. Demonstration by the polymerase chain reaction of mixed *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* infections undetected by conventional microscopy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **86** (6): 609-12.
- Bruce-Chwatt L.J. 1982. Chemotherapy of Malaria. *Parasitology* **85**: 615-616.
- Bruce-Chwatt L.J. 1986. Chemotherapy of Malaria. Bruce-Chwatt (2<sup>a</sup> edition). *World Health Organization*, Geneva.
- Bruce M.C., Macheso A., McConnachie A., Molyneux M.E. 2011. Comparative population structure of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium falciparum* under different transmission settings in Malawi. *Malaria Journal* **10** (38): 2-12.
- Bruce M.C., Macheso A., Kelly-Hope L.A., Nkhoma S., McConnachie A. & Molyneux M.E. 2008. Effect of Transmission Setting and Mixed Species Infections on Clinical Measures of Malaria in Malawi. *PLoS one* **3** (7): e2775.
- Bruce M.C. and Day K.P. 2002. Cross-species regulation of malaria parasitaemia in the human host. *Current Opinion in Microbiology* **5**: 431–437.
- Bruneel F., Hocqueloux L., Alberti C., Wolff M., Chevret S., Bedos J.P., Durand R., Le Bras J., Regnier B., Vachon F. 2003. The clinical spectrum of severe imported *falciparum* malaria in the intensive care unit: report of 188 cases in adults. *Am J Respir Crit Care Med*. **167**: 684–689.
- Cambournac F.J.C., Casaca V.R. 1956b. Data on endemic diseases reigning in the area of Mulondo (Rio Cunene, Angola). *An Inst Med Trop*. **13** (1-2): 17-25.
- Cambournac F.J.C., Gândara A.F., Casaca V.M. 1956a. Malaria prevention by the application of insecticides of residual action on the rural area south of Angola. *An Inst Med Trop*. **13** (3): 361-70.
- Cambournac F.J.C., Gândara A.F., Pena A.J. 1955c. Estudo da acção profilática do Daraprim numa comunidade indígena (Missão Católica do Huambo, Angola) *Anais do Instituto de Medicina Tropical* **12**: 341-358; 361-370.
- Cambournac F.J.C., José F. 1955b. Subsídios para o inquérito malariológico em Angola. Malária/Febre-amarela/Inquéritos. *Anais do Instituto de Medicina Tropical* **12** (1/2): 121-153.
- Cambournac F.J.C., Gândara A.F., Pena A.J., Teixeira W.L.G. 1955a. Subsídios para o inquérito malariológico em Angola. Missão de prospecção de endemias em Angola: *Anais do Instituto de Medicina Tropical* **XII** (1-2): 122-153.
- Cappellini M.D. & Fiorelli G. 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* **371**: 64–74.

- Carlson J., Nash G.B., Gabutti V., Al-Yaman F. and Wahlgren M. 1994. Natural protection against severe *Plasmodium falciparum* malaria due to impaired rosette formation. *Blood* **84** (11): 3909-3914.
- Carter R. & Mendis K.N. 2002. Evolutionary and Historical Aspects of the Burden of Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 564-594.
- Carvalho B.O., Matsuda J.S., Luz S.L.B., Martinez-Espinosa F.E., Leite J.A., Franzin F., Orlandi P.P., Gregoracci G.B., Lacerda M.V.G., Nogueira P.A. and Costa F.T.M. 2011. Gestational malaria associated to *Plasmodium vivax* and *Plasmodium falciparum* placental mixed-infection followed by foetal loss: a case report from an unstable transmission area in Brazil. *Malaria Journal* **10**: 178.
- Casals-Pascual C., Kai O., Cheung J.O.P., Williams S., Lowe B., Nyanoti M., Williams T.N., Maitland K., Molyneux M., Newton C.R.J.C., Peshu N., Watt S. M. and Roberts D. J. 2006. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood* **108** (8): 2569-2577.
- Cavasini C.E., Mattos L.C., Couto A.A., Bonini-Domingos C.R., Valencia S.H., Neiras W.C., Alves R.T., Rossit A.R.B., Castilho L., Machado R.L. 2007. *Plasmodium vivax* infection among Duffy antigen-negative individuals from the Brazilian Amazon region: an exception? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **101**. (10): 1042–1044
- Cavasini C.E. 2001. Tipagem molecular do sistema sangüíneo Duffy em indivíduos expostos à malária na Amazônia brasileira. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* **23** (2): 123-124.
- Chen Q., Schlichtherle M. & Wahlgren M. 2000. Molecular Aspects of Severe Malaria. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 439-450.
- Clark B.E. & Thein S.L. 2004. Review. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin. Lab. Haem.* **26**: 159–176.
- Clark I.A., Alleva L.M., Mills A.C. and Cowden W.B. 2004. Pathogenesis of Malaria and Clinically Similar Conditions. *Clin. Microbiol.* **17** (3): 509-539.
- Clark I.A. & Schofield L. 2000. Pathogenesis of Malaria. *Parasitology Today* **16** (10): 451-454.
- Clark I.A., Cowden W.B. 1999. Why is the pathology of *falciparum* worse than that of *vivax* malaria? *Parasitology Today* **15** (11): 458-461.
- Clemens R., Pramoolsinsap C., Lorenz R., Pukrittayakamee S., Bock H.L., White N.J. 1994. Activation of the coagulation cascade in severe *falciparum* malaria through the intrinsic pathway. *Br J Haematol.* **87**: 100–105.
- Cockburn I.A., Mackinnon M.J., O'Donnell A., Allen S.L., Moulds J.M., Baisor M., Bockarie M., Reeder J.C. and Rowe J.A. 2004. A human complement receptor 1 polymorphism that reduces *Plasmodium falciparum* rosetting confers protection against severe malaria. *PNAS.* **101** (1): 272–277. DOI 10.1073pnas.0305306101.

- Cohen S., Butcher G.A. and Mitchell G.H. 1974. Mechanisms of immunity to malaria. *Bull World Health Organization* **50**: 251-257.
- Collins W.E. & Jeffery G.M. 2005. *Plasmodium ovale*: parasite and disease. *Clinical Microbiology Reviews* **18** (3): 570-581. DOI:10.1128/CMR.18.3.570 – 581.
- COSEP-Consultoria de Serviços e Pesquisas, Lda; Consaúde-Consultoria de Gestão e Administração em Saúde, Lda. and Macro International Inc. 2007. Angola Malaria Indicator Survey (AMIS). 2006-07. *Calverton, Maryland: COSEP Lda., Consaúde Lda., and Macro International Inc.*
- Costa E., Barbot J., Coimbra E., Pinho L., et al. 1997. Déficit de glicose-6-fosfato desidrogenase em 10 famílias residentes no norte de Portugal. *Arquivos de Medicina* **11** (2): 87-91.
- Coura J.R., Suárez-Mutis M., Ladeia-Andrade S. 2006. A new challenge for malaria control in Brazil: asymptomatic *Plasmodium* infection-A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **101** (3): 229-237.
- Cox-Singh J., Davis T.M.E., Lee K.S., Shamsul S.S.G., Matusop A., Ratnam S., Rahman H.A., Conway D.J. & Singh B. 2008. *Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 165-171.
- Crawley J., Chu C., Mtove G., Nosten F. 2010. Malaria in children. *Lancet* **375**: 1468-1481.
- Culleton R., Ndounga M., Zeyrek F.Y., Coban C., Casimiro P.N., et al. 2009. Evidence for the transmission of *Plasmodium vivax* in the Republic of the Congo, West Central Africa. *J Infect Dis.* **200**: 1465-1469.
- Culleton R., Mita T., Ndounga M., et al. 2008. Failure to detect *Plasmodium vivax* in West and Central Africa by PCR species typing. *Malaria Journal* **7**: 174.
- Cunha C.B. & Cunha B.A. 2008. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *Journal Vector Borne Dis.* **45** (29): 194-199.
- Cunha G., Martins M.R., Sousa R., Oliveira F.F. 2007. Estatística Aplicada às Ciências e Tecnologias da Saúde. *LIDEL-Edições Técnicas, Lda.*
- Day N.P.J., Phu N.H., Mai N.T.H., Chau T.T.H., Loc P.P., Van Chuong L., Sinh D.X., Holloway P., Hien T.T., White N.J. 2000. The pathophysiologic and prognostic significance of acidosis in severe adult malaria. *Crit. Care Med.* **28** (6): 1833–1840.
- Dessein A.J., Chevillard C., Marquet S., Henri S., Hillaire D. and Dessein H. 2001. Genetics of parasitic infections. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* **29** (4): 484–488.
- Dhorda M., Nyehangane D., Rénia L., Piola P., Guerin P. J., Snounou G. 2011. Transmission of *Plasmodium vivax* in South-Western Uganda: Report of Three Cases in Pregnant Women. *PLoSone* **6** (5): e19801. DOI:10.1371/journal.pone.001980.

- Dias M.F. 1985. Alterações da sensibilidade do *P. falciparum* à cloroquina-estudo numa população escolar residente numa zona periurbana de Luanda. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* **1** (4): 95-100.
- Dicionário Integral de Língua Portuguesa. 2009. *Texto Editores, Lda*. 1ª edição: 917.
- Dimmick W.W., Michael J.G., Michael J.G., Anne M.M., Daniel J.M. and David S.P. 2001. The Evolutionarily Significant Unit and Adaptive Criteria: A Response to Young. *Conservation Biology* **15** (3): 788-790.
- Dinis A.C. & Aguiar F.Q.B. 1969. Regiões Naturais de Angola. *Revista. Instituto de Investigação Agronómica de Angola (IIAA)*. Nova Lisboa. Angola. **7** (3).
- Di Nuzzo D.V.P. & Fonseca S.F. 2004. Anemia falciforme e infecções. *Sickle cell disease and infection. Jornal de Pediatria* **80** (5): 347-354.
- Dobbie M., Crawley J., Waruiru C., Marsh K., Surtees R., 2000. Cerebrospinal fluid studies in children with cerebral malaria: an excitotoxic mechanism? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **62**: 284–290.
- Dolo A., Modiano D., Maiga B., Daou M., Dolo G., Guindo H., BA M., Maiga H., Coulibaly D., Perlman H., Blomberg M.T., Touré Y.T., Coluzzi M. & Doumbo O. 2005. Difference in susceptibility to malaria between two sympatric ethnic groups in Mali. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **72** (3): 243-248.
- Dondorp A.M., Kager P.A., Vreeken J. and White N.J. 2000. Abnormal blood flow and red blood cell deformability in severe malaria. *Parasitology Today* **16** (6): 228-232.
- Dräger S., Gedik G. and Dal Poz M.R. 2006. Health workforce issues and the Global Fund to fight AIDS, Tuberculosis and Malaria: an analytical review. *Human Resources for Health* **4**: 23. DOI:10.1186/1478-4491-4-23.
- Driss A., Hibbert M.J., Wilson O.N., Shareen A.I., Thomas V.A., Jonathan K.S. 2011. Genetic polymorphisms linked to susceptibility to malaria. *Malaria Journal* **10**: 271. DOI: 10.1186/1475-2875-10-271.
- Dronamraju K.R., Arese P., Rich S.M., Ayala F.J. 2006. Evolutionary Origins of Human Malaria Parasites. *Malaria: Genetic and Evolutionary Aspects*. Ed. Springer Science. USA.
- Ehrhardt S., Burchard G.D., Mantel C., Cramer J.P., Kaiser S., Kubo M., Otchwemah R.N., Bienzle U. & Mockenhaupt F.P. 2006. Malaria, Anemia, and Malnutrition in African Children-Defining Intervention Priorities. *Journal of Infectious Diseases* **194**: 108-114.
- Enevold A., Vestergaard L.S., Lusingu J., Drakeley C.J., Lemnge M.M., Theander T.G., Bygbjerg Ib.C. and Alifrangis M. 2005. Rapid screening for glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and haemoglobin polymorphisms in Africa by a simple high-throughput SSOP-ELISA method. *Malaria Journal* **4**: 61.

- English M. 2000. Life-threatening severe malarial anaemia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94**: 585-588.
- Falconer D. 1993. Quantitative genetics in Edinburgh: 1947-1980 Perspectives anecdotal, historical and critical commentaries on genetics. Edited by *James F. C. and William F. D. Genetics* **133**: 137-142.
- Faye F.B.K., Spiegel A., Tall A., Sokhna C., Fontenille D., Rogier C., and Trape J.F. 2002. Diagnostic criteria and risk factors for *plasmodium ovale* malaria. *The Journal of Infectious Diseases* **186** (5): 690-695.
- Ferreira A., Marguti I., Bechmann I., Jeney V., Chora A., Palha N.R., Rebelo S., Henri A., Beuzard Y. and Soares M.P. 2011. Sick Hemoglobin Confers Tolerance to *Plasmodium* Infection. *Cell* **145**: 398-409.
- Ferreira A., Balla J., Jeney V., Balla G., Soares M.P. 2008. A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link? *J Mol Med.* **86**: 1097-1111.
- Flick K. & Chen Q. 2004. *var* genes, PfEMP1 and the human host. *Molecular and Biochemical Parasitology* **134** (1): 3-9. DOI: 10.1016/j.
- Flint J., Harding R.M., Boyce A.J., Clegg J.B. 1998. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol.* **11**: 1-51.
- Fortes F.J. 2011. Perfil Epidemiológico das principais doenças parasitárias endêmicas em Angola (Malária, Tripanossomose Humana Africana, Oncocercose, Shistosomose Urinária). *Dissertação de Doutoramento*. CMDT/IHMT- UNL. Lisboa, Portugal.
- Fowkes F.J.I., Michon P., Pilling L., Ripley R.M., Tavul L., Imrie J.I., Woods C.M., Mgone C.M., Luty A. JF., and Day K.P. 2008. Host erythrocyte polymorphisms and exposure to *Plasmodium falciparum* in Papua New Guinea. *Malaria Journal* **7**:1.
- Fundo Global de Luta Contra a AIDS, Tuberculose e Malária. 2009. *Toolkit de Monitoramento e Avaliação. Parte 2: Ferramentas de monitoramento*. 3a edição.
- Galiano S., Gaetani G.F., Barabino A., Cottafava F., Zeitlin H., Town M., Luzzatto L. 1990. Favism in the African type of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (A<sup>-</sup>). *BMJ.* **300**: 236-7.
- Galinski M.R. & Barnwell J.W. 2008. *Plasmodium vivax*: who cares? *Malaria Journal* **7** (1):S9 DOI:10.1186/1475-2875-7-S1-S9.
- Garnham P.C.C. 1966. *Plasmodium ovale*, *Plasmodium simium*, *Plasmodium fieldi* and *Plasmodium simiovale*. Malaria parasites and other haemosporidia. *Blackwell Scientific Publications* **216**-243.
- Gentilini M., Trape J.F., Danis M., Richard-Lenoble D., Brucker G. and Felix H. 1981. Imported malaria in a hospital in Paris. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **75** (3): 455-460.

- Gilbert S.C., Plebanski M., Gupta S., Morris J., Cox M., Aidoo M., Kwiatkowski D., Greenwood B.M., Whittle H.C. & Hill A.V.S. 1998. Association of malaria parasite population structure HLA and immunological antagonism. *Science* **279**: 1173-1177.
- Glader B. *et al.* 2010. Clinical manifestations of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. ©2010 UpToDate. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
- Greene L.S. 1993. G6PD deficiency as protection against *falciparum* malaria: an epidemiologic critique of population and experimental studies. *Yearb Phys Antropol.* **36**: 153–78.
- Greenwood B.M. 2008. Control to elimination: implications for malaria research. *Elsevier Ltd.* DOI:10.1016/j.pt.2008.07.002.
- Greenwood B. 2002. The molecular epidemiology of malaria. *Tropical Medicine and International Health* **7** (12): 1012-1021.
- Greenwood B.M. 1997. The epidemiology of malaria. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **91** (7): 763-9.
- Greenwood B., Marsh K., Snow R. 1991. Why do some African children develop severe Malaria? *Parasitology Today* **7** (10): 277-281.
- Guerra CA, Howes RE, Patil AP, Gething PW, Van Boeckel TP, et al. 2010. The International Limits and Population at Risk of *Plasmodium vivax* Transmission in 2009. *PLoS Negl Trop Dis.* **4**(8): e774. DOI:10.1371/journal.pntd.0000774.
- Guindo A., Traore K., Diakite S., Wellems T.E., Doumbo O.K. and Diallo D.A. 2011. An evaluation of concurrent G6PD (A–) deficiency and sickle cell trait in Malian populations of children with severe or uncomplicated *P. falciparum* malaria. *American Journal of Hematology* **86**: 795–796. DOI: 10.1002/ajh.22093.
- Guindo A., Fairhurst R.M., Doumbo O.K., Wellems T.E., Diallo D.A. 2007. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *PLoS Med.* **4** (3): e66. DOI:10.1371/journal.pmed.0040066.
- Hänscheid T. 2003. Current strategies to avoid misdiagnosis of malaria. *Clinical Microbiology and Infection* **9** (6): 497–504. DOI: 10.1046/j.1469-0691.2003.00640.x.
- Hay S.I., Guerra C.A., Gething P.W., Patil A.P., Tatem A.J. et al. 2009. A World Malaria Map: *Plasmodium falciparum*. Endemicity. In 2007. *PLoS Med.* **6** (3): e1000048.
- Hay S.I. & Snow R.W. 2006. The malaria atlas project: Developing global maps of malaria risk. *PLoS Med.* **3** (12): e473. DOI:10.1371/journal.pmed.0030473.
- Heddi A., Chen Q., Obiero J., Kai O., Fernandez V., Marsh K., Muller W.A., and Wahlgren M. 2001. Binding of *plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to soluble platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): Frequent recognition by clinical isolates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65** (1): 47-51.
- Hedrick P.W. 2011. Review. Population genetics of malaria resistance in humans. *Heredity* **1**:22.

- Hedrick P. 2004. Short Communication. Estimation of relative fitnesses from relative risk data and the predicted future of haemoglobin alleles S and C. *J. Evol. Biol.* **17**: 221-224.
- Hill A.V.S. 2001. The genomics and genetics of human infectious disease susceptibility. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **2**: 373-400.
- Hill A.V.S. 1996. Genetic susceptibility to malaria and other infectious diseases: from the MHC to the whole genome. *Parasitology* **112**: S75-S84.
- Hill A.V.S., Allsopp C.E.M., Kwiatkowski D., Anstey N.M., Twumasi P., Rowe P.A., Bennett S., Brewster D., McMichael A.J. & Greenwood B.M. 1991. Common West African HLA antigens are associated with protection from severe malaria. *Nature* **352**: 595-600.
- Hviid L. 2005. Naturally acquired immunity to *Plasmodium falciparum* malaria in Africa. *Acta Tropica* **95**: 270-275.
- Ho M. & White N.J. 1999. Molecular mechanisms of cytoadherence in malaria. *Am J Physiol Cell Physiol.* **276** (6): 1231-1242.
- Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* **6**: 65-70.
- Hunt N.H. & Grau G.E. 2003. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends in Immunology* **24** (9): 491-499.
- IIAA- Instituto de Investigação Agronómica de Angola- Caracterização Sumária das Condições Fisiográficas de Angola, s/d.
- INE-Instituto Nacional de Estatística. 2010. Inquérito Integrado Sobre o Bem-estar da População (IBEP) 2008-09. Principais resultados definitivos (Versão Resumida). *Ministério do Planeamento*. Angola.
- Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica-Ministério das Telecomunicações e Tecnologias de Informação de Angola. 2010. *Departamento de Aplicações Meteorológicas*.
- Jeffery G. 1966. Epidemiological significance of repeated infections with homologous and heterologous strains and species of *Plasmodium*. *Bull World Health Organ.* **35**: 873-882.
- Jenkins T., Blecher S.R., Smith A.N. and Anderson C.G. 1967. Some hereditary red-cell traits in kalahari Bushmen and Bantu: Hemoglobins, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and blood groups. *Am J Hum Genet.* **23** (5): 513-532. PMID: PMC1706762.
- Júnior M.N. 2011. A Crise e os Países em Desenvolvimento. *Jornal de Angola*. 22 Julho.
- Keri JE, Thomas K, Berman B, Falabella A. 2000. Purpura fulminans in a patient with malaria. *Eur J Dermatol.* **10**: 617-619.
- Koch G.G. & Gansky S.A. 1996. Statistical considerations for multiplicity in confirmatory protocols. *Drug Information Journal* **30**: 523-533.

- Komba A.N., Makani J., Sadarangani M., Ajala-Agbo T., Berkley J.A., Newton C.R.J.C., Marsh K. and Williams T.N. 2009. Malaria as a Cause of Morbidity and Mortality in Children with Homozygous Sickle Cell Disease on the Coast of Kenya. *Clinical Infectious Diseases* **49**: 216–22.
- Kotlowski A. 1993. An overview of pathophysiological theories in *Plasmodium falciparum* cerebral malaria with the special reference to the role of cytokines. *Institute of Maritime and Tropical Medicine* **44** (45): 1-4.
- Kwiatkowski D.P. 2005. How malaria has affected the human genome and what human genetics can teach us about malaria. *American J. Human Genetics* **77**: 171–192.
- Kwiatkowski D. 1999. The molecular genetic approach to malarial pathogenesis and immunity. *Parasitology* **41**: 233-240.
- Kwiatkowski D., Bate C.A.W., Scragg I.G., Beattie P., Udalova I., Knight J.C. 1997. The malarial fever response-pathogenesis, polymorphism and prospects for intervention. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* **91** (5): 533-542.
- Kwiatkowski D., Hill A.V.S., Sambou I., Twumasi P., Castracane J., Manogue K.R., Cerami A., Brewster D.R., Greenwood B.M. 1990. TNF concentration in fatal cerebral, non-fatal cerebral and uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Lancet* **336**: 1201-1204.
- Kyes S., Horrocks P., Newbold C. 2001. Antigenic variation at the infected red cell surface in malaria. *Annu Rev Microbiol.* **55**: 673–707.
- Labie D. & Elion. J. 2005. Bases moléculaires et physiopathologiques des maladies de l'hémoglobine. *Hématologie EMC (Elsevier Masson SAS)*.
- Lapoumeroulie C., Dunda O., Ducrocq R., Trabuchet G., Mony-Lobe M., Bodo J.M., Carnevale P., Labie D., Elion J., Krishnamoorthy R. 1992. A novel sickle cell mutation of yet another origin in Africa: the Cameroon type. *Hum Genet.* **89**: 333–336.
- Laveran C.L.A. (1845-1922).1982. A newly discovered parasite in the blood of patients suffering from malaria. Parasitic etiology of attacks of malaria, Constantine and Algeria. *Reviews of Infectious Diseases* **4** (4).
- Lebakeng T. & Phalane M. 2001. Africanisation of the social sciences within the context of globalisation. *Codesria Bulletin* **25**: 28.
- Lee S., Kara U., Koay E., Lee M., Lam S. & Teo D. 2002. New strategies for the diagnosis and screening of malaria. *Int J Hematol.* **76**: 291-293.
- Le Port A., Cot M., Etard J., Gaye O., Migot-Nabias F., Garcia A. 2008. Relation between *Plasmodium falciparum* asymptomatic infection and malaria attacks in a cohort of Senegalese children. *Malaria Journal* **7**: 193. DOI: 10.1186/1475-2875-7-193.
- Le Van K.C .1995. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. *Nat Genet.* **10**: 224–228.



- Liechti M.E., Zumsteg V., Hatz C.F.R., Herren T. 2003. *Plasmodium falciparum* Cerebral Malaria Complicated by Disseminated Intravascular Coagulation and Symmetrical Peripheral Gangrene: Case Report and Review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.***22**: 551–554.
- Lim Y., Mahmud R., Chew C.T. T. & Chua K. 2010. *Plasmodium ovale* infection in Malaysia: first imported case. *Malaria Journal* **9**: 272.
- Looareesuwan S., Warrell D.A., White N.J., Chanthavanich P., Warrell M.J., Chantaratherakitti S., Changswak S., Chongmankongcheep L., Kanchanaranya C. 1983. Retinal hemorrhage, a common sign of prognostic significance in cerebral malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 911–915.
- Loscertales MP., Owens S., O'Donnell J., Bunn J., Bosch-Capblanch X., Brabin B.J. 2007. ABO blood group phenotypes and *Plasmodium falciparum* malaria: unlocking a pivotal mechanism. *Advances in parasitology* **65**:1-50 DOI:18063095.
- Losert H, Schmid K, Wilfing A, Winkler S, Staudinger T, Kletzmayr J, Burgmann H. 2000. Experiences with severe *P. falciparum* malaria in the intensive care unit. *Intensive Care Med.* **26**:195–201.
- Luzzatto L. 2006. Editorials & perspectives. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype. *Haematologica/The Hematology Journal* **91** (10): 1303-6.
- Mackinnon M.J., Gunawardena D.M., Rajakaruna J., Weerasingha S., Mendis K.N., Carter R. 2000. Quantifying genetic and nongenetic contributions to malarial infection in a Sri Lankan population. *PNAS* **97** (23): 12661–12666.
- Mackintosh C.L., Beeson J.G. & Marsh K. 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in Parasitology* **20** (12):597-603.
- Makani J., Williams T.N., and Marsh K. 2007. Sick cell disease in Africa: burden and research priorities. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **101** (1): 3– 14.
- Marques P.X., Saúte F., Pinto V.V., Cardoso S., Pinto J., Alonso P.L., Do Rosário V.E., Arez. A.P. 2005. Plasmodium species mixed infections in two areas of Manhica district, Mozambique. *International Journal of Biological Sciences* **1** (3): 96-102.
- May J., Meyer C.G., Großterlinden L., Ademowo O.G., Mockenhaupt F.P., Olumese P.E., Falusi A.G., Luzzatto L. and Bienzle U. 2000. Red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase status and pyruvate kinase activity in a Nigerian population. *Tropical Medicine and International Health* **5** (2): 119-123.
- Mayor A., Aponte J.J., Fogg C., Saúte F., Greenwood B., Dgedge M., Menendez C., and Alonso P.L. 2007. The epidemiology of malaria in adults in a rural area of southern Mozambique. *Malaria Journal* **6**:3 DOI:10.1186/1475-2875-6-3.
- Mayxay M., Pukrittayakamee S., Newton P. and White N.J. 2004. Mixed-species malaria infections in humans. *TRENDS in Parasitology* **20** (5): 233-240.

- McGuire W., Knight J.C., Hill A.V.S., Allsopp C.E.M., Greenwood B.M., Kwiatkowski D. 1999. Severe malarial anemia and cerebral malaria are associated with different tumor necrosis factor promoter alleles. *Journal of Infectious Diseases* **179**: 287-290.
- McKenzie F.E. & Bossert W.H. 1999. Multispecies *plasmodium* infections of humans *J Parasitol.* **85** (1): 12–18.
- McKenzie F.E. & Bossert W.H. 1997b. Mixed-species plasmodium infections of humans. *J Parasitol.* **83** (4): 593–600.
- McKenzie F.E. & Bossert W.H. 1997a. Mixed-species *plasmodium* infections of anopheles (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* **34** (4): 417–425.
- McKenzie F.E. & Bossert W.H. 1997. The dynamics of *plasmodium falciparum* blood-stage infection. *Journal of Theoretical* **188**: 127-140.
- McKenzie F., Jeffery G. & Collins W. 2002. *Plasmodium malariae* infection boosts *Plasmodium falciparum* gametocyte production. *Am J Trop Med Hyg.* **67** (4): 411- 414.
- McKenzie F.E., Smith D.L., O'Meara W.P., Forney J.R., Magill A.J., Permpanich B., Erhart L.M., Sirichaisinthop J., Wongsrichanalai C., and Gasser Jr R.A. 2006. Fever in patients with mixed-species malaria. *Clin Infect Dis.* **42** (12): 1713-1718.
- McQueen P.G. & McKenzie F.E. 2006. Competition for red blood cells can enhance *Plasmodium vivax* parasitemia in mixed-species malaria infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **75** (1): 112-125.
- Medana I.M. & Turner G.D.H. 2006. Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *International Journal for Parasitology* **36**: 555–568.
- Medana I.M., Hunt N.H. and Chaudhri G. 1997. Tumor necrosis factor- alpha expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *American Journal of Pathology* **150** (4): 1473-1486.
- Mehta A., Mason P.J. and Vulliamy T.J. 2000. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillière's Clinical Haematology* **13** (1): 21-38.
- Ménard D., Barnadas C., Bouchier C., Henry-Halldin C., Gray LR. et al. 2010. *Plasmodium vivax* clinical malaria is commonly observed in Duffy-negative Malagasy people. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **107**: 5967-5971.
- Mendes C., Dias F., Figueiredo J., Mora V.G., Cano J., de Sousa B., do Rosário V.E., Benito A., Berzosa P. and Arez A.P. 2011. Duffy negative antigen is no longer a barrier to *plasmodium vivax*-molecular evidences from the African west coast (Angola and Equatorial Guinea). *PLoS Negl Trop Dis.* **5** (6): e1192.
- Miller L.H. 1994. Impact of malaria on genetic polymorphism and genetic diseases in Africans and African Americans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 2415-2419.
- Miller L.H., Good F. M., Milon G. 1994. Malaria Pathogenesis. *Science* **264**: 1878-1883.

- Miller L.H., Mason S.J., Clyde D.F., McGinniss M.H. 1976. The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy. *N Engl J Med.* **295**: 302–304.
- Millimono T.S., Loua K.M., Rath S.L., Relvas L., Bento C., Diakite M., Jarvis M., Daries N., Ribeiro L.M., Manco L. & Kaeda J.S. 2011. High prevalence of hemoglobin disorders and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6pd) deficiency in the republic of Guinea (West Africa). *Hemoglobin* **0**: 1-13.
- Milner D.A., *et al.* 2009. Pathogenesis of malaria. ©2010 UpToDate. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
- Ministério de Educação (República Popular de Angola).1982. Atlas Geográfico.Vol 1.
- MINPLA/INE-Ministério do Planeamento/Instituto Nacional estatístico (INE). 2010.“Inquérito Integrado sobre Bem Estar da População (IBEP-2008/2009)” Principais Resultados Definitivos (Versão resumida). Luanda.
- MINSa-Ministério da Saúde da República de Angola. 2009. Programa Nacional de Controlo da Malária. Relatório Anual.
- Miranda J., Gonçalves N., Picanço I., Do Rosário V.E., Faustino P. and Arez A.P. 2007. Sick-Cell Trait and Red Cell G6PD Status and Malaria Morbidity in Angola. *5th International Congress on Tropical Medicine and International Health*.
- MIM-The Multilateral Initiative on Malaria. 1997. About MIN. available <http://www.mimalaria.org/eng/aboutmin.asp>.
- Min-Oo G. & Gros P. 2005. Microreview. Erythrocyte variants and the nature of their malaria protective effect. *Cellular Microbiology* **7** (6): 753-763.
- Molineaux L., Storey J., Cohen J.E., Thomas A. 1980. A longitudinal study of human malaria in the West African savanna in the absence of control measures: Relationships between different Plasmodium species, in particular P. falciparum and P. malariae. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **29** (5): 725–737.
- Molineaux L. & Gramiccia G. 1980. Le Projet Garki-Recherches sur l'épidémiologie du paludisme. *Organisation Mondiale de la Santé*: **153** (173): 243-261.
- Molineaux L. 1988. The epidemiology of human malaria as an explanation of its distribution, including some implications for its control. In: *Wernsdorfer WH., McGregor I., editors. Malaria*. Edinburgh U.K. Churchill Livingstone: 913-998.
- Molyneux M.E., Taylor T.E., Wirima J.J. & Borgsteinj A. 1989. Clinical features and prognostic indicators in pediatric cerebral malaria: A study of 131 comatose Malawian children. *QJM*. **71**: 441-459.
- Moody A. 2002. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clinical. Microbiology. Rev.* **15** (1): 66-78.

- Moody A. & Chiodini P. 2000. Methods for the detection of blood parasites. *Clin Lab Haematol.* **22** : 189-201.
- Moody A. 2002. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. *Clinical Microbiology Reviews*: 66–78. DOI: 10.1128/CMR.15.1.66–78.2002.
- Mouchet J., Pierre C., Marc C., Jean J., Sylvie M., Dominique RL., Jacques S. 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde. *Éditions John Libbey Eurotext*: **22**-155: ISBN 2-7420-0452-1.
- Moxon C.A., Grau G.E. and Craig A.G. 2011. Malaria: modification of the red blood cell and consequences in the human host. *British Journal of Haematology* **154**: 670-679.
- Murteira B., Ribeiro C., Silva J., *et al.*, 2002. Introdução à Estatística- *McGrawHill*. 2ª edição.
- Narasimhan V. & Attaran A. 2003. Roll Back Malaria? The scarcity of international aid for malaria control *Malaria Journal* **2**: 8. DOI:10.1186/1475-2875-2-8.
- Nascimento T.S., Pereira R.O.L., De Mello H.L.D. & Costa J. 2008. Metemoglobinemia: do diagnostic ao tratamento. *Revista Brasileira de Anestesiologia* **58** (6): 651-664.
- Naylor CE, Rowland P, Basak K, *et al.* 1996. Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme. *Blood* **87**: 2974–82.
- Ntoumi F. & Priebe G. 2010. Africanizing scientific knowledge: the Multilateral Initiative on Malaria as a model? *Malaria Journal* **9** (3): 57.
- Ohr C., Purnomo, Sutarnihardja M.A., Tang D., Kain K.C. 2002. Impact of microscopy error on estimates of protective efficacy in malaria-prevention trials. *J. Infect. Dis.* **186**: 540:6.
- O’Meara W.P., Mangeni J.N., Steketee R., Greenwood B. 2010. Review. Changes in the burden of malaria in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis.* **10**: 545-55.
- Omi K., Ohashi J., Patarapotikul J., Hananantachai H., Naka I., Looareesuwan S., Tokunaga K. 2003. CD36 Polymorphism is associated with protection from cerebral malaria. *The American Society of Human Genetics* **72**: 364-374.
- OMS-Organización Mundial De La Salud. 2006a. Anemia falciforme. Informe de la Secretaria 59ª *Asamblea Mundial De La Salud* **A59/9**.
- OMS-Organisation Mondiale de la Santé. 2006b. Drepanocytose dans la region africaine: Situation actuelle et perspectives. *Rapport du Directeur régional Comité Régional De L’afrique*. FR/RC56/1717juin.
- Owusu-Agyei S., Asante K.P., Adjuik M., Adjei G., Awini E., Adams M., Newton S., Dosoo D., Dery D., Agyeman-Budu A., Gyapong J., Greenwood B. and Chandramohan D. 2009. Epidemiology of malaria in the forest-savanna transitional zone of Ghana. *Malaria Journal* **8** (220): 1-10. DOI: 10.1186/1475-2875-8-220.

- Pain A, Urban B.C., Kai O., Casals-Pascual C., Shafi J., and Marsh K., Roberts D.J. 2001. A non-sense mutation in CD36 gene is associated with protection from severe malaria. *Lancet* **357**: 1502–1503.
- Pasvol G., Weatherall D.J. & Wilson R.J.M. 1978. Cellular mechanism for the protective effect of haemoglobin S against *P. falciparum* malaria. *Nature* **274**: 701-703.
- Pinto J., Sousa C.A., Gil V., Gonçalves L., Lopes D., do Rosario V.E. and Charlwood J.D. 2000. Mixed-species malaria infections in the human population of São Tomé island, West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94**: 256-257.
- PNCM-Programa Nacional de Controle da Malária, UNICEF- Fundo das Nações Unidas para a Infância, Consaúde, Lda. 2006. Malária em Angola (1998 – 2005), Progressos e Lições. Relatório:1-26.
- PNCM-Programa Nacional de Controle da Malária, Consaúde, Lda. 2009. Malária em Angola Progressos e Lições. Relatório:1-26.
- Pombo D.J. et al. 2002. Immunity to malaria after administration of ultra-low doses of red cells infected with *Plasmodium falciparum*. *Lancet* **360**: 610–617.
- Portero J.L., Yuste M.R., Descalzo M.A., Raso J., Lwanga M., Obono J., Nseng G., Benito A., Cano J. 2010. Accuracy of an immunochromatographic diagnostic test (ICT malaria combo cassette test) compared to microscopy among under five-year-old children when diagnosing malaria in Equatorial Guinea. *Malaria research and treatment* **2010**: 1-6.
- Pradel G. & Frevert U. 2001. Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology* **33** (5):1154–1165.
- Price R.N. et al.1996. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet* **347**:1654–1658.
- Priebe G. 2010. Africanising scientific knowledge - MIM and malaria research in postcolonial dilemma.
- RBM/WHO-Roll Back Malaria. 2010b. Partnership: Economic costs of malaria. Roll Back Malaria. *World Health Organization*. <http://www.rbm.who.int/cmc>.
- RBM/WHO-Roll Back Malaria. 2010a. Fase de impacto e progresso. Financiamento e utilização de recursos para o combate à malária: A primeira década da campanha Roll Back Malaria. *Organização Mundial da Saúde em nome do Roll Back Malaria Partnership Secretariat*. (Reimpressão).
- Redinha J. 1975. Etnias e culturas de Angola. *Instituto de Investigação Científica de Angola*. (IICA).Luanda.
- Reiter P. 2008. Global warming and malaria: knowing the horse before hitching the cart. *Malaria Journal* **7**: S3.

- Richie T.L. 1988. Interactions between malaria parasites infecting the same vertebrate host. *Parasitology* **96**: 607–639.
- Robert V.K., Macintyre J.K., Trape J.F., Duchemin J.B., Warren J. and Beier J.C. 2003. Malaria transmission in urban sub-saharan Africa. *J. Trop. Med. Hyg.* **68** (2): 169–176.
- Roberts D.J. et al. 2010. Protection against malaria in the hemoglobinopathies. © 2010 UpToDate. www.uptodate.com.
- Rogerson S.J., Grau G.E. and Hunt N.H. 2004. The Microcirculation in Severe Malaria. *Microcirculation* **11**: 559–576. DOI: 10.1080/10739680490503311.
- Rogier C., Commenges D., Trape J.F. 1996. Evidence for an age-dependent pyrogenic threshold of *Plasmodium falciparum* parasitémia in highly endemic populations. *Am J Trop Med Hyg.* **54**: 613–9.
- Rosenberg R., Wirtz R.A., Lanar D.E., Sattabongkot J., Hall T., Waters A.P. and Prasittisuk C. 1989. Circumsporozoite protein heterogeneity in the human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Science* **245** (4921): 973–976.
- Rosenberg R: 2007. *Plasmodium vivax* in Africa: hidden in plain sight? *Trends Parasitol.* **23** (5): 193–196.
- Ruwende C. & Hill A. 1998. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and malaria. *J.Mol.Med.* **76**: 581–588.
- Ruwende C., Khoo S.C., Snow R.W., Yates S.N.R., Kwiatkowski D., Gupta S., Warn P., Allsopp C.E.M., Gilbert S.C., Peschu. et al. 1995. Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature* **376**: 246–249.
- Ryan J.R., Stoute J.A., Amon J., Dunton R.F., Mtalib R., Koros J., Owour B., Luckhart S., Wirtz R.A., Barnwell J.W., Rosenberg R. 2006. Evidence for transmission of *Plasmodium vivax* among a Duffy antigen negative population in Western Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* **75**: 575–581.
- Sabeti P., Usen S., Farhadian S., Jallow M., Doherty T., Newport M., Pinder M., Ward R. & Kwiatkowski D. 2002. CD40L association with protection from severe malaria. *Genes and Immunity* **3**: 286–291.
- Sambo M.R., Trovada M.J., Benchimol C., Quinhentos V., Gonçalves L., Velosa R., Marques I., Sepúlveda N., et al. 2010. Transforming growth factor beta 2 and heme oxygenase 1 genes are risk factors for the cerebral malaria syndrome in Angolan children. *PLoS ONE* **5**: e1114.
- Satoh H., Tani K., Yoshida M.C., Sasaki M., Miwa S., Fujii H. 1988. The human liver-type pyruvate kinase (PKL) gene is on chromosome 1 at band q21. *Cytogenet. Cell Genet.* **47**: 132–133.

- Schlichtherle I.M., Treutiger C.J., Fernandez V., Carlson J., Wahlgren M. 1996. Molecular aspects of severe malaria. *Parasitology Today* **12** (9): 329-332.
- Schofield L. & Grau G.E. 2005. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* **5**: 722-735.
- Seixas E., Gozzelino R., Chora A., Ferreira A., Silva G., Larsena R., Rebelo S., Penido C., Smith N.R., Coutinho A., Soares M.P. 2009. Heme oxygenase-1 affords protection against non cerebral forms of severe malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106** (37): 15837–15842. DOI 10.1073 pnas.0903419106.
- Sherman I. W. (Ed). 1998. Malaria, Parasite Biology, Pathogenesis and Protection. Department of Biological University of California edited by *Sherman, Irwin.* W.ASM.Press, Washington.
- Snounou G. 2004. Cross-species regulation of *Plasmodium* parasitaemia cross-examined. *Trends in Parasitology* **20** (6): 262-265.
- Snounou G. & White N.J. 2004. The co-existence of *Plasmodium*: sidelights from *falciparum* and *vivax* malaria in Thailand. *Trends in Parasitology* **20** (7): 333-339.
- Snounou G., Viriyakosol S., Zhu X., Jarra W., Pinheiro L., Do Rosario V., Thaithong S. & Brown K. N. 1993. High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction. *Molecular and Biochemical Parasitology* **61**: 315-320.
- Snow R.W., Noor A.M., Myint H.Y., Hay S.I. 2005. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **434**: 214-217.
- Snow R.W., Craig M.H., Deichmann U., le Sueur D. 1999a. A Preliminary Continental Risk Map for Malaria Mortality among African Children. *Parasitology Today* **15** (3): 99-104.
- Snow R.W., Omumbo J.A., Lowe B., Molyneux C.S., Obiero J.O., Palmer A., Weber M.W., Marsh K. 1997. Relation between severe malaria morbidity in children and level of *Plasmodium falciparum* transmission in Africa. *Lancet* **349**: 1650-1654.
- Sturm A., Amino R., de Sand C., Regen T., Retzlaff S., Rennenberg A., Krueger A., Pollok J.M., Menard R., Heussler V.T. 2006. Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science* **313** (5791): 1287-1290.
- Sutherland C.J., Tanomsing N., Nolder D., Oguike M., Jennison C., Pukrittayakamee S., Dolecek C., Hien T.T., do Rosario V.E., Arez A.P., *et al.* 2010. Two nonrecombining sympatric forms of the human malaria parasite *Plasmodium ovale* occur globally. *Journal of Infectious Diseases* **201**: 1544-1550.
- Takeda M., Kikuchi M., Ubalee R., Na-Bangchang K., Ruangweerayut R., Shibahara S., Imai S., Hirayama K. 2005. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to cerebral malaria in Myanmar. *J Infect Dis.* **58**: 268-271.

- Tanser F.C., Sharp B., Le Sueur D. 2003. Potential effect of climate change on malaria transmission in Africa. *Lancet* **362**: 1792-1798.
- Taylor T.E. *et al.* 2010. Treatment of severe *falciparum* malaria. ©2010 UpToDate. [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com).
- Taylor T. & Strickland G. 2000. Malaria. *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*: 614-643.
- Tishkoff S.A, Varkonyi R., Cahinhinan N., Abbes S., Argyropoulos G., *et al.* 2001. Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6pd: Recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science* **293**: 455-462.
- Torres F.R., Bonini-Domingos C.R., *et al.* 2005. Hemoglobinas humanas - Hipótese malária ou efeito materno? *Revista Brasileira Hematol.Hemoter.***27** (1): 55-60.
- Trampuz A., Jereb M., Muzlovic I. & Prabhu R. 2003. Clinical review: Severe malaria. *Critical Care* **7** (4): 315-323.
- Trape J.F., Peelman P., Morault-Peelman B. 1985. Criteria for diagnosing clinical malaria among a semi-immune population exposed to intense and perennial transmission. *Trans R Soc Trop Med Hyg.***79**: 435-42.
- UN DESA-Population Division of Department of Economic and Social Affairs of United Nations. 2010. World Populations Prospects: the 2010 Revision. <http://esa.un.org/unpd/wpp/index> .
- UNFPA. 2010. Estado de la Población Mundial 2010. *Fondo de Población de las Naciones Unidas*.
- Valentini G.; Chiarelli, L.R.; Fortin, R.; Dolzan, M.; Gallizzi, A.; Abraham, D.J.; Wanh, C.; Bianchi, P.; Zanella, A.; Mattevi. 2002. A. Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. Molecular basis of nonspherocytic hemolytic anemia. *J. Biol. Chem.* **277**: 23807-23814.
- Vanderberg J.P. & Frevert U. 2004. Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of *Plasmodium berghei* sporozoites injected into skin by mosquitoes. *International Journal for Parasitology* **34**: 991-996.
- van Hellemond J.J., Rutten M., Koelewijn R., Zeeman A.M., Verweij J.J., Wismans P.J., Kocken C.H., and van Genderen P.J.J.2009. Human *Plasmodium knowlesi* Infection Detected by Rapid Diagnostic Tests for Malaria. *Emerging Infectious Diseases* **15** (9).
- van Solinge W.W., van Wijk H.Á., Kraaijenhagen R.J., Rijksen G., Nielsen F.C. 1997. Novel mutations in the human red cell type pyruvate kinase gene: two promoter mutations in cis, a splice site mutation, a nonsense- and a three missense mutations. *Blood* **90**: 1197.
- Verra F., Mangano V.D. & Modiano D. 2009. Genetics of susceptibility to *Plasmodium falciparum*: from classical malaria resistance genes towards genome-wide association studies. *Parasite Immunology* **31**: 234-253.



- Vitoria M., Granich R., Gilks CF., Gunneberg C., Hosseini M., Were W., Raviglione M., De Cock KM. 2009. The global fight against HIV/AIDS, tuberculosis and malaria status and future perspectives. *Am J Clin Pathol.* **131**: 844-848.
- Vulliamy T., Luzzatto L., Hirono A., Beutler E. 1997. Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* **23** (15): 302-313.
- Warrell D.A., Looareesuwan S., Warrell M.J., Kasemsarn P., Intaraprasert R., Bunnag D., and Harinasuta T. 1982. Dexamethasone proves deleterious in cerebral malaria-a double-blind trial in 100 comatose patients. *N Engl J Med.* **306**: 313-319.
- Warrell D.A. 1997. Cerebral malaria: Clinical features, pathophysiology and treatment. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **91** (7): 875-884.
- Waterfall C.M. & Cobb D.B. 2001. Single tube genotyping of sickle cell anaemia using PCR-based SNP analysis. *Nucleic Acids Research* **29** (23) e119: 1-8.
- Weatherall DJ. & Clegg JB. 2002. Genetic variability in response to infection: malaria and after. *Genes and Immunity* **3**: 331-337.
- Weatherall D.J., Miller L.H., Baruch D.I., Marsh K., Doumbo O.K., Casals-Pascual C. & Roberts D.J. 2002. Malaria and the Red Cell. *Hematology* **1**: 35-57.
- Webster J. 2001. Malaria Data Base Angola. RBM Complex Emergency. *World Health Organization* (draft).
- White N. 2011. The parasite clearance curve. *Malaria Journal* **10**: 278.
- White N. J. 2003. Manson's Tropical Diseases. *Elsevier Science*. **21** th edition: 1205-1295.
- White N.J. 2002. The assessment of antimalarial drug efficacy. *Trends in Parasitology* **18**: 458–464.
- White N.J. & Ho M. 1992. The pathophysiology of malaria. *Academic Press Limited* **31**: 85-149.
- White N.J. & Plorde J.J. 1991. Malaria. *Harrison's Principles of Internal Medicine* **12** (1): 782-788.
- WHO. 2011. Global health observatory data repertory. *World Health Organization* <http://apps.who.int/glodata>.
- WHO. 2010c. World Malaria Report 2010. *World Health Organization*. Geneva.
- WHO. 2010b. Guidelines for the treatment of malaria. *World Health Organization*. Second edition. Geneva.
- WHO. 2010a. Good procurement practices for artemisinin-based antimalarial medicines. Global Malaria Programme. *World Health Organization*. Geneva.

- WHO. 2009. World Malaria Report 2009. WHO Global Malaria Programme. *World Health Organization*. Geneva. ISBN 978 92 4 1564106.
- WHO. 2008b. Management of hemoglobin disorders. Report of a joint who-tif meeting.1-92. *World Health Organization*.
- WHO. 2008a. World Malaria Report 2008. *World Health Organization*. Geneva.
- WHO. 2007. Position Statement on ITNs. Global Malaria Programme. *World Health Organization*. Geneva. <http://apps.who.int/malaria/docs/itn/ITNspospaperfinal.pdf>.
- WHO. 2006b. Guidelines for the treatment of malaria. *World Health Organization* WHO/HTM/MAL/2006.1108 ISBN 92 4 154694 8.
- WHO. 2006a. Management of birth defects and hemoglobin disorders: Report of a joint WHO-. March of Dimes Meeting. *World Health Organization*. Geneva, Switzerland.
- WHO. 2004. Prevention and Control of Malaria Epidemics: Forecasting, Prevention, Early Detection and Control - From Policy to Practice. Report of an Informal Consultation, Leysin. *World Health Organization*. Geneva.
- WHO. 2003. A Practical Guideline for Prevention and Control of Malaria Epidemics in Africa (Draft). *World Health Organization*. Geneva.
- WHO. 2002. Report of the Third Meeting of the Technical Support Network for Prevention and Control of Malaria Epidemics. December10–11, 2001. *World Health Organization*. Geneva.
- WHO/RBM. 2001b. Malaria Early Warning Systems: Concepts, Indicators and Partners. A Framework for Field Research in Africa. *World Health Organization*. Geneva. WHO/CDS/RBM 80.
- WHO. 2001a. Commission on Macroeconomics and Health. Macroeconomics and Health: Investing in Health for Economic Development. *World Health Organization*. Geneva.
- WHO. 2000b. Severe *falciparum* malaria. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **94** (1): ISSN 0035-9203.
- WHO. 2000a. Management of severe malaria - A Practical Handbook. *World Health Organization*. Geneva.
- WHO. 1999b. The World Health Report 1999. *World Health Organization*. Geneva.
- WHO. 1999a. New perspectives malaria diagnosis. Report of a joint WHO/USAID informal consultation WHO/MAL/2000.1091. *World Health Organization*. Geneva.
- WHO. 1996b. The World Health Report. Fighting disease, fostering development. *World Health Organization*. Geneva.
- WHO. 1996a. Proposal for accelerating the implementation of the regional malaria control strategy: WHO-AFRO. *World Health Organization*. Geneva.

- WHO. 1990. Severe and complicated malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **84** (1): 1-65.
- WHO. 1994. Measurement of overall and cause-specific mortality in infants and children: memorandum from a WHO/UNICEF meeting. *Bull World Health Organ.* **72**: 707–713.
- Williams T.N. 2006a. Human red blood cell polymorphisms and malaria. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 388-394.
- Williams T.N. 2006b. Red blood cell defects and malaria. *Molecular and Biochemical Parasitology* **149**: 121-127.
- Williams T.N., Mwangi T.W., Wambua S., Alexander N.D., Kortok M., Snow R.W., Marsh K. 2005a. Sick cell trait and the risk of *Plasmodium falciparum* malaria and other childhood diseases. *Journal of Infectious Diseases* **192**: 178–86.
- Williams T.N., Mwangi T.W., Roberts D.J., Alexander N.D., Weatherall D.J., Wambua S., Kortok M., Snow R.W., Marsh K. 2005b. An immune basis for malaria protection by the sickle cell trait. *PLOS Medicine* **2** (5):e128. DOI:10.1371/journal.pmed.0020128.
- Williams T.N., Maitland K., Bennett S., Ganczakowski M., Peto T.E.A., Newbold C.I., Bowden D.K., Weatherall D.J. and Clegg J.B.1996. High incidence of malaria in  $\alpha$ -thalassaemic children. *Nature* **383**: 522 - 525. DOI:10.1038/383522a0.
- Williamson J. & Cover B. 1971. Removal of white blood cells from gametocyte, schizont, trophozoite and ring stages of *Plasmodium falciparum*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **65**: 416.
- World Bank. 2010. Angola-Perfil do País. <http://go.worldbank.org/Q16TR361PO>.
- Worrall E., Rietveld A. and Delacollette C. 2004. The burden of malaria epidemics and cost-effectiveness of interventions in epidemic situations in Africa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **71** (2): 136–140.
- Yoshida A. 1989. Evolution of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants A<sup>+</sup> and A<sup>-</sup>. *Blood.* **74**: 1860-1861.
- Yoshida A. & Beutler E.1986. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. *Academic Press, Inc.*
- Yuthavong Y., Bunyaratvej A., Kamchonwongpaisan S. 1990. Increased susceptibility of malaria-infected variant erythrocytes to the mononuclear phagocyte system. *Blood Cells, Molecules and Diseases* **16**: 591-7.
- Zago M.A., Silva W.A., Dalle B., Gualandro S., Hutz M.H., Lapoumeroulie C., Tavella M.H., Araujo A.G., Krieger J.E., Elion J. & Krishnamoorthy R. 2000. Atypical  $\beta$ s haplotypes are generated by diverse genetic mechanisms. *American Journal of Hematology* **63**: 79-84.

- Zakeri S., Najafabadi S.T., Zare A., Djadid N.D. 2002. Detection of malaria parasites by nested PCR in south-eastern, Iran: Evidence of highly mixed infections in Chahbahar district. *Malaria Journal* **1** (2): 1-6.
- Zaman S., Tan L., Chan H.H., Aziz L., Abdul-Samat S., Wahid R., Kamal A., Ahmed M. & Zaman V. 2001. The detection of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in DNA-extracted blood samples using polymerase chain reaction. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **95**: 391-397.
- Zanella A., Fermo E., Bianchi P., Chiarelli L.R., Valentini, G. 2007. Pyruvate kinase deficiency: The genotype-phenotype association. *Blood Rev.* **21** (4): 217-231.
- Zanella A. & Bianchi P. 2000. Red cell pyruvate kinase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.* **13**: 57-81.
- Zhou M., Liu Q., Wongsrichanalai C., Suwonkerd W., Panart K., Prajakwong S., Pensiri A., Kimura M., Matsuoka H., Ferreira M.U., Isomura S. and Kawamoto F. 1998. High prevalence of *Plasmodium malariae* and *Plasmodium ovale* in malaria patients along the Thai-Myanmar border, as revealed by acridine orange staining and PCR-based diagnoses. *Tropical Medicine & International Health* **3**: 304-312.
- Zimmerman P.A., Patel S.S., Maier A.G., Bockarie M.J. & Kazura J.W. 2003. Erythrocyte polymorphisms and malaria parasite invasion in Papua New Guinea. *Trends in Parasitology* **19** (6): 250-252.
- Zimmerman P.A., Mehlotra R.K., Kasehagen L. and Kazura J.W. 2004. Why do we need to know more about mixed *Plasmodium* species infections in humans? *Trends in Parasitology* **20** (9): 440-447.

# CAPÍTULO. 8

---

## ANEXOS

## VIII. ANEXOS

### Lista de Anexos

<b>Anexos</b>	<b>Título</b>
<b>1</b>	Questionário do projecto: Efeito de factores do hospedeiro e parasitários na susceptibilidade à malária e gravidade da doença.
<b>2</b>	Declaração de Consentimento Livre e Informado



**PROJECTO: EFEITO DE FACTORES DO HOSPEDEIRO E PARASITÁRIOS  
NA SUSCEPTIBILIDADE À MALÁRIA E GRAVIDADE DA DOENÇA**  
**QUESTIONÁRIO:** \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Código \_\_\_\_\_

**CLASSIFICAÇÃO:** Infecção Assintomática (IA) \_\_\_\_\_

Malária não-Complicada (Mnc) \_\_\_\_\_

Malária grave (MG) \_\_\_\_\_

**1. DADOS PESSOAIS:**

Idade \_\_\_\_\_ anos

Sexo \_\_\_\_\_

Residência \_\_\_\_\_

Ocupação \_\_\_\_\_

**2. CLÍNICA e HISTÓRIA PREGRESSA**

Tempo de Permanência em Angola \_\_\_\_\_ anos

História anterior de malária \_\_\_\_\_

Numero de episódios por ano \_\_\_\_\_

Antecedentes de anemia \_\_\_\_\_

**3. SINTOMAS CLÍNICOS NA ADMISSÃO**

Duração dos sintomas \_\_\_\_\_ dias

Peso \_\_\_\_\_ Kg

Temperatura axilar \_\_\_\_\_ graus C

Frequência respiratória \_\_\_\_\_ ciclos/m

Frequência cardíaca \_\_\_\_\_ T. A. \_\_\_\_\_ mmHg

Prostração \_\_\_\_\_

Icterícia \_\_\_\_\_

Diarreia \_\_\_\_\_

Vómitos \_\_\_\_\_

Mialgias \_\_\_\_\_

Artralgias \_\_\_\_\_

Sonolência \_\_\_\_\_

Cefaleias \_\_\_\_\_

Hidratado \_\_\_\_\_

Convulsões \_\_\_\_\_



4. **DADOS LABORATORIAIS**

4.1 Hemoglobina \_\_\_\_\_

4.2 Hematócrito \_\_\_\_\_

4.3 N° Leucócitos \_\_\_\_\_

4.4 Parasitemia na admissão D0 \_\_\_\_\_ parasitas/mm<sup>3</sup>.

5. **CRITÉRIOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DE GRAVIDADE (OMS)**

Coma \_\_\_\_\_ Escala Glasgow \_\_\_\_\_

- Convulsões (nas 3 h seguintes à hospitalização) .....
- Ausência de reflexos corneanos.....
- Rigidez de descerebração.....
- Sinais de disfunção multiorgânica.....
- I.R.A.....
- E.P.A.....
- Hemorragia retiniana.....
- Esquizontemia periférica .....
- Hiperparasitemia > 250.000 parasitas/*ul*.....
- Leucocitose periférica > 10.000/mm<sup>3</sup>. ....
- Hematócrito < 15%.....
- Hemoglobina < 50 g/l .....
- Glicemia < 40 mg/dl . ....
- Ureia > 60 mg/dl.....
- Creatinina > 265 µmol/l .....
- Glicose diminuída no L.C.R. ....
- Acido láctico aumentado no L.C.R. (> 6mmol /l) .....
- Acido láctico venoso aumentado ( > 6 mmol /l) .....
- Aminotransferases aumentadas 3x.....
- Aumento da γ GT .....
- Aumento da 5' nucleotidase plasmática.....
- Baixos níveis de Antitrombina III.....

6. Tratamento administrado \_\_\_\_\_

**PROJECTO: EFEITO DE FACTORES DO HOSPEDEIRO E PARASITÁRIOS NA  
SUSCEPTIBILIDADE À MALÁRIA E GRAVIDADE DA DOENÇA.**

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO**

Li o Documento de informação ao Doente, que descreve a finalidade e natureza do estudo. Foram-me dadas oportunidades de fazer perguntas sobre o estudo.

Declaro que fui informado sobre todos os passos deste estudo e que me foram dadas de forma clara todas as explicações relacionadas com este projecto.

Também fui informado de que poderei não aceitar em participar deste estudo, se esta for a minha vontade, sem ser penalizado ou seja, essa minha decisão não diminui nem altera os meus direitos ou os do meu filho (a), ao internamento, consultas e tratamento nesta unidade hospitalar, isto quer dizer que continuarei a fazer as análises necessárias ao controlo da minha situação de saúde e a ter os medicamentos adequados.

Ao assinar dou o meu consentimento para que os meus registos médicos e ou os do meu filho (a) possam ser consultados pela Comissão de Ética, pelos representantes da investigação ou por uma inspecção estatal. Concordo também que estas entidades possam ter acesso aos meus registos médicos para este e para outros estudos que possam ter relação com este, mesmo que eu saia do estudo.

Quando esses dados forem usados para conhecimento dos resultados, de forma falada, em reuniões, ou escrita em revistas científicas, serão apresentados em conclusões ou perguntas, com números ou não, mas sempre em conjunto e sem nomes.

Entendo que poderei não sentir, como pessoa, qualquer benefício, isto é, diferença para melhor por causa deste estudo. Sei que os benefícios deste estudo podem fazer-se sentir daqui a alguns anos, ou não, para o grupo geral de pessoas afectadas e infectadas pelo *Plasmodium*.

Concordo voluntariamente em participar neste estudo, permitindo que me seja colhida uma amostra de sangue, por picada no dedo, por lanceta.

Nome do Doente (Printed) -----

Assinatura do Doente  
ou impressão digital

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_

O Processo de Consentimento Informado foi conduzido por:

Nome: (Printed) -----

Assinatura do Profissional:-----Data: -----

**PROJECTO: EFEITO DE FACTORES DO HOSPEDEIRO E PARASITÁRIOS NA  
SUSCEPTIBILIDADE À MALÁRIA E GRAVIDADE DA DOENÇA.**

DOCUMENTO DE INFORMAÇÃO AO DOENTE PARA PARTICIPAÇÃO NO PROTOCOLO DE  
INVESTIGAÇÃO

O Sr. (Sra.) ou o seu filho (a), foi escolhido (a) pelo seu médico-assistente e equipa deste serviço para participar num estudo de Caso-Controlo sobre “Efeito de Factores do Hospedeiro e Parasitários na Susceptibilidade à Malária e Gravidade da Doença, aprovado pelo Comité de Ética Nacional.

**Por favor, leia estas informações com atenção.**

**Pergunte à equipa presente o que achar necessário. A sua participação é livre e, caso não queira tomar parte do estudo, a atenção médica para a sua situação de saúde será garantida.**

**1. Objectivos gerais do estudo**

Pretendemos com este estudo investigar sobre o efeito protector ou não, dos défices enzimáticos e outras alterações dos glóbulos vermelhos, em relação à malária.

**2. Justificação**

Propomo-nos no nosso estudo avaliar a contribuição das alterações genéticas relacionados com as células sanguíneas e a composição da(s) população(ões) parasitária(s) presentes na infecção e o efeito destes factores na susceptibilidade à malária e gravidade da doença.

Para uma pesquisa conclusiva é muito importante analisar amostras obtidas a partir de diferentes grupos num estudo de caso-controlo cuidadosamente desenhado, no qual seja possível comparar diferentes níveis de malária (indivíduos infectados e sem sintomas, doentes com malária não complicada e malária grave). Estão previstas a participação de mais de 500 pessoas neste estudo.

**3. Procedimentos**

Se o Sr.(Sra.) aceitar participar ou permitir a participação do seu filho(a) neste estudo, será preenchido um questionário com os seus dados, que será guardado em conjunto com os questionários dos restantes pacientes. O Sr.(Sra.) poderá ter acesso a eles na presença do seu médico assistente ou de outro membro da equipa, se assim o desejar. Será colhida uma amostra de sangue por picada no dedo, por lanceta.

**4. Garantia de sigilo**

Todas as informações obtidas durante o estudo serão confidenciais, isto é, são segredo profissional e não podem ser comentadas. No caso de publicação do estudo, o Sr.(Sra.) ou o seu filho(a) não será identificado(a).

**5. Despesas:**

A sua participação no estudo não envolve despesas adicionais com outros exames além dos previstos para as suas consultas ou internamento.

Também não receberá qualquer pagamento pela sua participação.

**6. Garantia de informação**

O Sr.(Sra.), seu parente ou responsável, têm o direito de fazer qualquer pergunta à equipa presente.

A sua participação é voluntária, e mesmo que não aceite participar no estudo beneficiará dos cuidados de saúde devidos. Se considerar que está bem esclarecido, por favor leia a folha a seguir e caso esteja tudo claro para si e queira participar do nosso estudo, assine juntamente com o membro da equipa, a declaração anexa.

